VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS ASSOZIATIONSVERHALTEN DER AKROZENTRISCHEN CHROMOSOMEN MENSCHLICHER FIBROBLASTENMITOSEN AUS PLAZENTA- UND HAUTBIOPSIEN

Michael Bierner

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553807_0041

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE, MÜNCHEN

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS ASSOZIATIONSVERHALTEN DER AKROZENTRISCHEN CHROMOSOMEN MENSCHLICHER FIBROBLASTEN-MITOSEN AUS PLAZENTA- UND HAUTBIOPSIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Bierner
aus München

1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv.Doz.Dr. K.D. Zang
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Zander
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	4.12.1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

M E I N E N E L T E R N

I N D A N K B A R K E I T

G E W I D M E T

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

EINLEITUNG

Allgemeines über die Anordnung von Metaphasechromosomen
Die Assoziationen akrozentrischer Chromosomen
Zielsetzung dieser Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

1. Hautfibroblasten
2. Plazentafibroblasten
3. Assoziationskriterien
4. Durchgeführte Berechnungen

ERGEBNISSE

1. Quantitative Untersuchungen
2. Verteilung der DD-, DG- und GG-Assoziationen
3. Individuelle Unterschiede

DISKUSSION

1. Quantitative Unterschiede und ihr Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren
2. Qualitative Unterschiede
3. Individuelle Unterschiede
4. Die in allen Berechnungen aufgetretenen Häufigkeitsunterschiede
   1. Geschlechtsunterschiede
   2. Die Beurteilungskriterien
   3. Die Präparationstechnik
   4. Das Alter des Gewebes
   5. Die Herkunft des Gewebes

ZUSAMMENFASSUNG

IM ANHANG: TABELLEN DER ROHWERTE

LITERATURVERZEICHNIS

E I N L E I T U N G

Allgemeines über die Anordnung von Metaphasechromosomen.

Schon kurz nachdem eine genauere Analyse des genetischen Materials des Menschen möglich geworden war, beschäftigten sich viele Publikationen mit der Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte. Bald stellte man fest, daß die Verteilung nicht rein zufällig ist. Einige Untersucher konnten zeigen, daß homologe Chromosomen näher beisammen liegen, als nach dem Zufall zu erwarten wäre (SCHNEIDERMAN and SMITH 1962; BARTON and DAVID 1962 und 1963; MERRINGTON and PENROSE 1964; SADISVAIHAH und Mitarb. 1969). Andere Veröffentlichungen zeigten, daß Geschlechtschromosomen, so das zweite X-Chromosom bei der Frau und das Y-Chromosom beim Mann eine mehr periphere Lage in der Metaphaseplatte einnehmen, während die kleinen Chromosomen D, E und G mehr zentral liegen (BARTON and DAVID 1963 und 1964; MILLER et al. 1963 a, b; RAICU et al. 1970; KIKUCHI and SANDBERG 1965).

Über diese von der Zufallserwartung abweichenden Lagebeziehungen der Chromosomen wurden verschiedene Spekulationen angestellt. Da die Geschlechtschromosomen zu den sich am spätesten replizierenden Chromosomen gehören, könnten Vorgänge, die die späte DNS-Replizierung betreffen, die periphere Lage dieser Chromosomen mitbedingen. KOWARCZYK und STEINHAUS (1965, 1966 a und b, 1967 a und b) glaubten bei ihren Assoziationsuntersuchungen, daß die in der Metaphaseplatte festzustellenden Verteilungsmuster Restzustände einer in früheren Phasen bestehenden Ordnung sind. Diese Ordnung werde durch die während der Präparation auftretenden Einflüsse weitgehend zerstört.

Bei zytogenetischen Untersuchungen an einigen Pflanzenarten berichtete DE WAGENAAR (1969) in der Telophase und frühen Prophase End- zu End-Assoziationen homologer Chromosomen, die immer wieder und in einer für jede Pflanze spezifischen Anordnung auftraten und lange Ketten und Ringe bildeten. Er stellte die Hypothese auf, daß diese Fixierungen eine wichtige Funktion bei der DNS-Verdoppelung spielen könnten. Die erreichte enge Nachbarschaft homologer Chromosomen könnte deren Verdoppelung erleichtern.

In diesem Zusammenhang fand COMINGS (1970) bei Chromosomenuntersuchungen des Menschen, daß Chromatinfäden mit Fragmenten der Kernmembran assoziiert waren und diese Verbindung auch über die Mitose hinweg erhalten blieb. Bei Untersuchungen in der Meiose waren die Chromatinfäden sternförmig angeordnet, das heißt, sie liefen aus verschiedenen Richtungen an einen Punkt zusammen. Diese Kreuzungspunkte, von denen mehrere existierten, sind während der Interphase mit "annuli" an der Kernmembran befestigt (COMINGS und OKADA, 1970). Auch wenn die Kernmembran zerstört und die "annuli" beiseite gedrängt würden, bleibe die sternförmige Anordnung der Chromatinfäden während der Zellteilung erhalten. So könne dieses Verteilungsmuster von Zellzyklus zu Zellzyklus erhalten bleiben und eine reibungslose Verdoppelung der DNS erleichtern (COMINGS 1970).

LAMPERT, BAHR und DuPRAW (1969) fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von assoziierten Chromosomen bei einem Burkitt-Tumor feine dünne Chromatinfäden, die von einem Chromosom zum anderen zogen. HOSKINS (1968) machte dazu die wichtige Beobachtung, daß die DNS bei diesen Verbindungen zwischen den Chromosomen eine bedeutende Rolle spielt. In seinen Experimenten versuchte HOSKINS mit einer Mikronadel aus einer lebenden Zelle in der Metaphase Chromosomen herauszuziehen. Dabei stellte er fest, daß alle Chromosomen in der Zentromerregion wie bei einer Perlenkette miteinander verbunden blieben. Diese Chromosomenkette war dehnbar. Nach

Behandlung mit RNase oder Proteinandauung verlor die Kette ihre Dehnbarkeit, aber nicht ihren Zusammenhalt. Dieser ging erst nach Behandlung mit DNase verloren. HOSKINS hatte diese fädigen Verbindungen zum Spindelapparat gerechnet. Da sich die Chromatinfäden färberisch deutlich vom Spindelapparat unterscheiden, bezweifelt DuPRAW (1970) eine solche Interpretation. Er glaubt vielmehr, daß das, was man lichtmikroskopisch an Assoziationen sieht, durch diese eigenständigen DNS-haltigen Verbindungen erklärt werden könne.

Auch die Assoziationen akrozentrischer Chromosomen, die bei der Untersuchung menschlichen Zellmaterials gehäuft gefunden werden, sind nach DuPRAW (1970) Folgen solcher fädigen Verbindungen. Er stützt sich dabei u.a. auf die von ZANG und BACK (1968) beschriebenen Befunde.

Die Assoziationen akrozentrischer Chromosomen

Die akrozentrischen Chromosomen sind durch ihre Größe und durch ihre charakteristische Form sicher und leicht zu identifizieren. Den beiden Gruppen D und G ist gemeinsam, daß an ihren außerordentlich kurzen Armen stielartig ausgezogene sekundäre Konstriktionen und Satelliten zu finden sind. FERGUSON-SMITH and HANDMAKER (1961) beschrieben als erste ein, nur den Satelliten tragenden Chromosomen eigenes Phänomen, daß sich diese mit ihren kurzen Armen sehr eng zusammenlagern können. Diese Erscheinung wurde bereits von FERGUSON-SMITH als sehr häufig beschrieben und von ihm bei über 60 % der untersuchten Metaphaseplatten beobachtet. Er bezeichnete dieses Phänomen als "Satellitenassoziation" (SA); weitere quantitative Untersuchungen dieses Phänomens folgten bereits kurz nach der Erstbeschreibung (HARNDEN 1961; HUNGERFORD 1961; OHNO et al. 1961; EDWARDS 1961; PETERSEN und THERKELSEN 1961; SHAW 1961; VAN BRINK 1961).

Die große Beachtung, die diese Assoziationen gefunden haben, hat vermutlich 2 Gründe; einen subjektiven, der in der leichten Identifizierbarkeit der akrozentrischen Chromosomen und der dadurch bedingten guten Erkennbarkeit der Assoziationen beruht. Der zweite Grund ist ein biologischer und betrifft Spekulationen über Zusammenhänge zwischen dem Assoziationsverhalten dieser Chromosomen, und einer gemeinsamen Beteiligung an der Nukleolenbildung, die sekundär zu einem Verkleben und Non-disjunction dieser Chromosomen führen könnte.

Den Zusammenhang zwischen akrozentrischen Chromosomen und Nukleolenbildung vermuteten schon HEITZ 1931 und später SCHULTZ und LAWRENCE 1949, die zeigten, daß die Nukleolen an ganz bestimmten Chromosomen, die HEITZ asymmetrische Trabantenchromosomen nannte, entstehen. Die Nucleoli sind RNS-reiche lichtmikroskopisch sichtbare basophile Strukturen, die an bestimmten Stellen einiger Chromosomen, den sogenannten "Nukleolus bildenden Regionen" (Nucleolus Organizing Regions = NOR) entstehen.

OHNO (1961); FERGUSON-SMITH und HANDMAKER (1961 a und b; 1963, 1964) nahmen an, daß in den menschlichen Zellen die charakteristischen kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen die wesentlichen Orte der Nukleolusbildung sind. SHAW 1961, FERGUSON-SMITH 1963 und KAHN und MARTIN 1967 fanden in Gegensatz zu anderen Autoren auch Assoziationen von akrozentrischen Chromosomen mit sekundären Konstriktionen anderer Chromosomen und brachten diese ebenfalls in Beziehung zur Nukleolenbildung.

HUBERMAN und ATTARDI (1967) konnten zeigen, daß allein die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen die DNS-Basensequenzen enthalten, die zu der ribosomalen RNS passen. HSU und Mitarbeiter (1965) wiesen Nukleolarsubstanzreste an den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen nach. Die genauen Orte der Kernkörperchenbildung sind kleine achromati-

sche Einschnitte, die im Mikroskop als sekundäre Konstriktionen zu sehen sind (HSU et al. 1967). Sie kommen dadurch zustande,da an diesen Stellen der Chromatinfaden weniger stark spiralisiert ist.

Somit ist es nicht ganz richtig wenn man von "Satellitenassoziationen" spricht, da die eigentlichen Satelliten an den D- und G-Chromosomen jenseits der assoziierenden, "Nukleolus-organisierenden" Abschnitte liegen und genetisch völlig inaktiv zu sein scheinen. Man sollte deshalb, nach ZANG (zitiert bei MÜLLER 1971) von Assoziationen akrozentrischer Chromosomen (AAC) sprechen. Wir werden diesen Ausdruck auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwenden.

Die an den einzelnen Chromosomen entstehenden Nukleolen zeigen eine Tendenz zu konfluieren und bringen dadurch die, die Nukleolarsubstanz bildenden, Chromosomen in eine sehr enge nachbarschaftliche Beziehung zueinander. Darauf wird das Entstehen des Assoziationsphänomens zurückgeführt (OHNO 1961). Man sieht gelegentlich bis zu sechs akrozentrische Chromosomen an einer Assoziationsfigur beteiligt.

FERGUSON-SMITH (1967) diskutiert als weitere Entstehungsmöglichkeit der Assoziationen die Paarung homologer Nukleolusorganisatoren von nicht-homologen Chromosomen.

FERGUSON-SMITH und HANDMAKER (1961) und OHNO (1961) als erste und später eine Reihe weiterer Autoren (HARNDEN 1961, KIOSSOGLOU 1964, TIPS 1964, LYONS 1965, ABBO und Mitarbeiter 1966, MERZ und PREMPREE 1966, SIEGEL und TOBIAS 1966, EVANS 1967, ROSENKRANZ und FLECK 1969, LUCHSINGER und Mitarbeiter 1969, NANKIN 1969, BACK und ZANG 1969) setzten AAC, besonders wenn sie gehäuft auftraten, in Bezug zur Entstehung von Translokationen, meiotischer oder mitotischer Non-disjunction und von Mosaiken.

Auch in der Meiose konnten FERGUSON-SMITH 1964 und EBERLE 1964 bei Untersuchungen im Pachytänstadium Assoziationen akrozentrischer Chromosomen nachweisen.
Durch das sehr enge Zusammenliegen der akrozentrischen Chromosomen mit ihren Zentromerregionen und ein ursächlich noch nicht sicher geklärtes Verharren in dieser Lage kann eine geordnete Anaphasenbewegung gestört werden und zu aneuploiden Chromosomensätzen führen.

Durch exogene oder endogene Einflüsse könnte der Nukleolus in seinem Aktivitätszustand bzw. seiner Konsistenz verändert werden, so daß er zu lange, d.h. über den Beginn der Prophase hinaus, bestehen bleibt. Dadurch würde ebenfalls eine reibungslose Anaphasenbewegung gestört, und es wäre möglich, daß zwei Chromosomen im Laufe der Zellteilung beisammenbleiben (Non-disjunction), anstatt sich auf zwei Tochterzellen zu verteilen (OHNO 1961, POLANI 1966).
An diesen Orten des Konfluierens und ggf. Persistierens sind Brüche des Chromosomenmaterials möglich, die dann falsch rekombinieren können. Dies diskutierte POLANI 1966 anhand eines Falles von Translokationsmongolismus.
Als Beispiel für eine exogene Beeinflussung des Nukleolus diskutierte EVANS (1967) Virusinfektionen. Viren könnten mit ihrer DNS in Interaktion mit der NOR-DNS treten und den Nukleolus in seinem Aktivitätszustand verändern. Dadurch könnten ebenfalls Chromosomenaberrationen entstehen.

Andere Forscher (LYONS 1965) glauben, daß auch beim Menschen ein sog. "sticky gene" zu vermehrter Chromosomenklebrigkeit und damit Non-disjunction führen könnte. Ein solches Gen ist seit langem beim Mais bekannt (BEADLE 1932). Eine solche Verklebung könnte bewirken, daß gerade die kleinen G-Chromosomen besonders häufig in die falsche Tochterzelle geschleppt werden.

ABBO und ZELLWEGER (1966) wiederum sehen in der Chromosomenverklebung die Folge einer direkten Gen-Wirkung, die zu ver-

mehrten Assoziationen führt. Sie fanden bei einigen Familien mit chromosomalen Mosaiken ein stark gehäuftes Auftreten von Assoziationen akrozentrischer Chromosomen bei verschiedenen Familienmitgliedern. Dies könnte eventuell für einen autosomal dominanten Erbgang mit inkonstanter Penetranz und Expressivität sprechen. Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Chromosomen von Patienten mit Erkrankungen, die Chromosomenaberrationen zeigen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen fielen aber sehr unterschiedlich aus. KIOSSOGLOU (1964), ROSENKRANZ und FLECK (1969), LUCHSINGER et al. (1969) fanden die AAC-Zahl bei Down's-Syndrom erhöht, ebenso beim Turner-Syndrom (NAUJOKS 1966, LUCHSINGER et al. 1969), während FRØLAND und MIKKELSEN (1964) sowohl bei Down's-Syndrom als auch bei Klinefelter-Syndrom keine Veränderung der Assoziationsrate gefunden hatten.

MERZ und PREMPREE (1964), SIEGEL und TOBIAS (1966) zeigten bei Zugabe von Thyroxin zu Zellkulturen sowohl ein Anwachsen der Nucleoli als auch ein Ansteigen der Assoziationsrate. Das gleiche fanden LUCHSINGER et al. (1969) auch bei mit Thyroxin behandelten Hypothyreosen. Ob eine Hyperthyreose eine Chromosomenaberration, speziell die Trisomie 21, auslösen kann, wurde diskutiert, ist aber noch sehr umstritten. NANKIN (1968) fand z.B. bei Patienten mit Thyreotoxikosen keine veränderten Assoziationsmuster. Ebenso fanden BACK und ZANG (1969) bei Müttern mongoloider Kinder normale Assoziationswerte. Es erschien deshalb wichtig, weitere Untersuchungen über das Assoziationsphänomen der akrozentrischen Chromosomen durchzuführen, da diese Lagebeziehung sehr häufig ist, und zum anderen über 50 % aller Chromosomenaberrationen die D- und G-Gruppe betreffen.

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Arbeiten versucht, das Problem der Assoziationen akrozentrischer Chromosomen besser zu verstehen. Dazu untersuchte man Zellmaterial unter verschiedensten Gesichtspunkten:

1. Quantitative Bestimmungen der absoluten Häufigkeit assoziierender Gruppen und der Anzahl der daran teilnehmenden Chromosomen.
2. Assoziationen mit spezifischen Regionen anderer Chromosomen.
3. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mitosen, zwischen verschiedenen Rassen und zwischen Personen unterschiedlichen Lebensalters.
4. Prüfung individueller Unterschiede.
5. Beeinflußbarkeit der Assoziationsmuster durch unterschiedliches Zellmaterial und durch unterschiedliche Kultur- und Präparationstechniken.

Vor allem untersuchte man hierzu Zellen gesunder Probanden (VAN BRINK et al. 1962, FRØLAND und MIKKELSEN 1964, REITALU 1964, BISHUN 1966, COHEN und SHAW 1967, ZANG und BACK 1968, BACK und ZANG 1969, PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA et al. 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969, HANSSON 1970 a und b), um Vergleichsdaten für die Assoziationswerte der Patienten zu haben.

ad 1: Es lassen sich kaum einheitliche Aussagen machen über die Häufigkeiten, in denen in den einzelnen Mitosen Assoziationen auftreten. Die Werte, die hierfür von den einzelnen Untersuchern angegeben werden, unterscheiden sich meist sehr stark voneinander (siehe Tab. 8 in Kapitel Diskussion). Diese Differenzen sind zum Teil durch die verschiedenen Beurteilungskriterien zu erklären, die zwei akrozentrische Chromosomen erfüllen müssen, um als assoziiert zu gelten (siehe Kap. Methodik).

Lange umstritten war die Frage, wieviele der 6 D- und 4 G-Chromosomen in einer Metaphase an Assoziationen beteiligt sein können. BISHUN 1966 zeigte, daß theoretisch jedes der zehn akrozentrischen Chromosomen assoziieren kann. Aber auch bei Beteiligung zahlreicher akrozentrischer Chromosomen in einer Mitose entstehen selten große Gruppen; im allgemeinen werden einfache Paarbildungen (DD, DG, GG) bevorzugt.

ad 2: Assoziationen akrozentrischer Chromosomen mit anderen Chromosomen sind möglich und erfolgen vor allem zu Orten sekundärer Konstriktionen (SHAW 1961, FERGUSON-SMITH und HANDMAKER 1963, KAHN und MARTIN 1967). Sie fallen aber quantitativ nicht ins Gewicht, und zeigen keine statistisch signifikante Bevorzugung bestimmter Chromosomen.

ad 3: Die Frage nach Geschlechtsunterschieden ist noch nicht ganz geklärt. GALPERIN 1968 und 1969 fand vermehrt Assoziationen bei weiblichem Untersuchungsmaterial. VAN BRINK 1962, FRØLAND und MIKKELSEN 1964, ZANG und BACK 1968 beobachteten keine Geschlechtsunterschiede. ROSENKRANZ und FLECK 1969, LUCHSINGER et al. 1969 beschreiben eine geringe Vermehrung der Assoziationen bei Männern. Wenn man aber in der von COHEN und SHAW 1967 vorgeschlagenen Weise den Anteil abzieht, den das Y-Chromosom der Männer bei den Assoziationen ausmacht bzw. ausmachen könnte, so verschwindet dieser Unterschied.

COHEN und SHAW 1967 führten große Untersuchungen über Assoziationen bei verschiedenen Rassen durch. Sie konnten hier keinerlei Unterschiede zeigen.
PROKOFIEVA-BELGOWSKAYA et al. 1968 studierten das Assoziationsverhalten in verschiedenen Lebensaltern des Probanden, und fanden, daß von der Geburt bis etwa zum 40. Lebensjahr die Assoziationsrate ansteigt, um dann zum Greisenalter hin wieder abzunehmen.

ad 4: ZANG und BACK 1968 wiesen erstmals für einzelne Individuen charakteristische Assoziationsmuster nach, die auch nach wiederholter Untersuchung stabil blieben (ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969, HANSSON 1970 a). Allgemein zeigte sich eine signifikante Verschiebung des statistisch erwarteten DD:DG:GG-Verhältnisses zugunsten einer Vermehrung der GG-Paare (REITALU 1964, COHEN und SHAW 1967, ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969, HANSSON 1970 a). Dies könnte

darauf zurückzuführen sein, daß die während der Präparation einwirkenden, die Chromosomen auseinandertreibenden Kräfte geringer auf die kleinen GG-Paare wirken als auf die anderen (ZANG und BACK 1968).

ad 5: FRØLAND und MIKKELSEN (1964) und PROKOFIEVA- BELGOVSKAYA et al. (1968) verglichen Mitosen von Fibroblasten und Lymphoblasten, und fanden bei Fibroblasten sehr viel geringere Assoziationshäufigkeiten. Diese wurden zusätzlich bei ein und dem selben Zellsystem entscheidend durch Kultivationsmethoden und Präparationstechniken beeinflußt (ZANG und BACK 1968, BACK und ZANG 1969, HANSSON 1970 b).

Zielsetzung dieser Arbeit

Es ist bekannt, daß besonders häufig pathologische Chromosomensätze bei zytogenetischen Untersuchungen von Spontanaborten gefunden werden. Auch hier betreffen die meisten Aberrationen Chromosomen der Gruppen D, G und E (CARR 1965). Deshalb empfahl die WHO (World Health Organization) in einem Memorandum 1966 ("Standardisation of Procedure for Chromosome Studies in Abortion") dieses Material auch auf "Satellitenassoziationen" zu untersuchen.

Es gibt nur wenige Arbeiten über die Assoziationshäufigkeiten bei Fibroblastenkulturen (HARNDEN 1961, FRØLAND und MIKKELSEN 1964, PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA et al. 1968). Sie sagen im allgemeinen aus, daß die Assoziationsrate gegenüber der von Blutkulturen stark vermindert ist.

Es erschien wesentlich, zu untersuchen, ob Fibroblasten unabhängig von ihrem Ursprungsgewebe im Hinblick auf ihr Assoziationsvermögen ein einheitliches Verhalten zeigen oder ob "herkunftsspezifische" Unterschiede bestehen, d.h. ob Zellen, die aus verschiedenen Organen stammen, unterschiedliche

Assoziationsneigung zeigen. Denn bei der Untersuchung von pathologischem Material muß man wissen, ob man es mit anderen Fibroblasten vergleichen kann oder ob Unterschieden, die die Herkunft des Gewebes betreffen, Rechnung zu tragen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Assoziationsmuster der akrozentrischen Chromosomen von Mitosen in vitro gezüchteten Hautbiopsiematerials mit demjenigen von Kulturen von Plazenten verglichen.
Zusätzlich führten wir an diesem Material quantitative Untersuchungen durch, wie sie von ZANG und BACK (1968) an Lymphozytenkulturen ausgeführt worden sind. Damit sollte der Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Blutkulturen ermöglicht werden.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Es wurde das Assoziationsverhalten akrozentrischer Chromosomen in Fibroblastenmitosen von insgesamt 30 Fällen untersucht. Dabei wurde in vitro gezüchtetes Biopsiematerial von 17 reifen menschlichen Plazenten (10 weibliche, 7 männliche) mit Hautbiopsiematerial von 13 chromosomal unauffälligen Patienten (10 männliche, 3 weibliche) unterschiedlichen Alters verglichen.

1. Hautfibroblasten

Die Zellzüchtung und Chromosomenanalyse erfolgte nach der Methode von LEJEUNE et al. 1959.
Den Patienten wurde eine kleine Hautbiopsie, in der Regel am Unterarm, entnommen. Das Gewebestück wurde scharfkantig in Partikel von ca. 0,5 mm Kantenlänge zerschnitten. Jeweils drei bis vier Partikel wurden mit einem Gemisch aus Hühnerembryonalextrakt und Hahnenplasma auf einem Deckglas in ca. 1 cm Abstand voneinander angeklebt und in ein LEIGHTON-Röhrchen verbracht. Dieses kam anschließend für ca. 2 bis 3 Stunden in den Brutschrank zum Trocknen, bis das Plasma koaguliert war. Zum Anlegen der Primärkultur erhielt jedes Röhrchen 1,0 ml Nährmedium (80 % synthetisches Medium McCoy 5 A und 20 % fötales Kälberserum). Nach dem Begasen (95 % Preßluft, 5 % CO_2; Phenolrot als PH-Indikator) wurden die Kulturen weiter stationär bebrütet.

Sechs Tage später wurde zum ersten Mal kontrolliert, ob die Explantate angewachsen waren oder nicht. Wenn ja, erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. In etwa wöchentlichem Rhythmus fand nun ein regelmäßiger Austausch des Mediums statt. Die Zeit, bis die Biopsien eine gute Zellproliferation zeigten, war für die einzelnen Gewebsansätze sehr un-

terschiedlich. Aber nach ca. drei bis vier Wochen waren die meisten Kulturen so weit, daß eine Subkultivation erfolgen konnte.
Die Subkultivierung erfolgte entsprechend dem sonst nur noch wenig gebräuchlichen Verfahren von LEJEUNE et al. (1959), das jedoch für unser Mikroverfahren besonders geeignet war, durch Ablösen der Primärexplantate und deren Verpflanzen auf neue Deckgläser. Die schon angewachsenen Fibroblastenkränze der Primärkultur bzw. der jeweils vorangegangenen Subkultur wurden mit neuem Medium beschickt, und nach ca. zwei bis vier Tagen für die Chromosomenanalyse verwendet. Um eine stärkere Synchronisation der Zellteilung zu erzielen, wurde eine Gelbverfärbung der Kulturen, d.h. PH-Verschiebung zum Sauren, abgewartet. Der anschließend durchgeführte Mediumwechsel führte jeweils zu einer Synchronisierung der Zellproliferation. 16 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde den Kulturen für sechs Stunden Colzemid in einer Endkonzentration von 0,25 mcg pro ml zugesetzt. Die Zugabe dieses Zytostatikums hemmt durch Zerstörung des Spindelapparats die Teilung der Zellen in der Metaphase und bewirkt eine Anreicherung in Teilung befindlicher Zellen für die spätere Chromosomenanalyse.
Bei der anschließenden Hypotoniebehandlung, die zur besseren Ausbreitung der Chromosomen in der Metaphaseplatte erfolgt, wurden die bewachsenen Deckgläser in 0,7-%iges Natriumcitrat getaucht und für 10 bis 15 Minuten in den Brutschrank gebracht. Hinterher führten wir die Fixation mit Methanol-Eisessig im Verhältnis 3:1 in mehreren Schritten durch.
Die Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend mit 1-%iger Orceinlösung gefärbt, und mit Eukitt eingedeckt.

2. Plazentafibroblasten

Die Plazentafibroblasten waren uns als fertige Chromosomen-Präparate zur Verfügung gestellt worden. Züchtung und Präparation waren im Institut für Humangenetik der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster (Direktor Prof. Dr. W. Lenz) von Dr. Pawlowitzki vorgenommen worden. Kultur und Ausarbeitung waren ebenfalls nach der Methode von LEJEUNE et al. 1959 erfolgt, mit dem einen Unterschied, daß vor der Ausarbeitung kein Colzemid zugegeben und die getrockneten Präparate mit Unnablau gefärbt wurden.
Bei der Auswertung wurde angestrebt, pro Fall etwa 50 Mitosen im Phasenkontrastmikroskop zu untersuchen und zu fotographieren. Eine Mitose wurde verwendet, wenn sie mindestens 42 Chromosomen enthielt und alle D- und G-Chromosomen vollständig und eindeutig identifizierbar vorhanden waren.

Assoziationskriterien

FERGUSON-SMITH und HANDMAKER, die als erste über "Satellitenassoziationen" berichteten, betrachteten zwei Chromosomen als assoziiert, wenn sie entweder fest miteinander verbunden waren ("definite SA") oder wenn ihr Abstand weniger als eine Chromatidbreite betrug ("adjacencies").
Die in der Folgezeit über Assoziationen arbeitenden Autoren folgten entweder diesem Schema oder aber den etwas flexibleren Kriterien von ZANG und BACK (1968).
In der vorliegenden Arbeit wurden die von ZANG und BACK (1968) angegebenen Assoziationskriterien verwendet. Danach müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein, wenn zwei akrozentrische Chromosomen als assoziiert gelten sollen (siehe auch Abb. 1 und 2):

1. Die Entfernung zwischen zwei akrozentrischen Chromosomen darf den längsten Arm des größten G-Chromo-

soms der betreffenden Mitose nicht überschreiten (= d in Abb. 1).

2. Wenn die kurzen Arme der Chromosomen durch zweifelsfrei sichtbare fädige Strukturen (sog. "Brükken") verbunden sind, können auch größere Entfernungen toleriert werden.
3. Falls die assoziierenden Partner auf exakt derselben Längsachse liegen, dürfen sie bis zur Länge des größten Armes eines D-Chromosoms voneinander entfernt sein.
4. Der kurze Arm eines assoziierenden akrozentrischen Chromosoms soll zum kurzen Arm seines Partnerchromosoms gerichtet sein, und darf nicht unterhalb von dessen "Zentromer-Linie" liegen. Die "Zentromer-Linie" ist die Linie, die das Zentromer senkrecht zur Längsachse des Chromosoms schneidet (vergleiche Abb. 1).
5. Gruppen und Reihen, also größere Assoziationskomplexe, wurden einmal als unabhängige Assoziationskomplexe vermerkt, zum anderen wurden sie in ihre assoziierenden Paare zerlegt, um ein Maß für die relative Häufigkeit assoziierter D- und G-Chromosomen zu erhalten. Ein Beispiel: Wir haben eine Reihe von drei Chromosomen D-G-D. Sie wird als "Dreierreihe" registriert, und als zweites werden ihre assoziierten Paare D-G und G-D vermerkt, während eine Gruppe von drei Chromosomen sich in drei Paare aufteilt (vergleiche Abb. 2).

In einer gesonderten Spalte wurden die Assoziationen mit fädigen Verbindungen aufgeführt.
Nach der Kennzeichnung der einzelnen Assoziationen bearbeitete sie nochmals ein zweiter Untersucher. Nur in ca. 3 % aller gefundenen Assoziationen war die Beurteilung der beiden Untersucher unterschiedlich. Hier einigte man sich mit

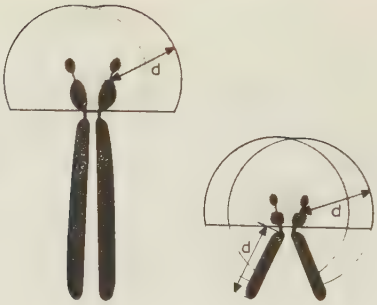

Abb. 1+): Kriterien für die Assoziation zwischen akrozentrischen Chromosomen (siehe Text); d = Länge des langen Arms eines G-Chromosoms der fraglichen Mitose.

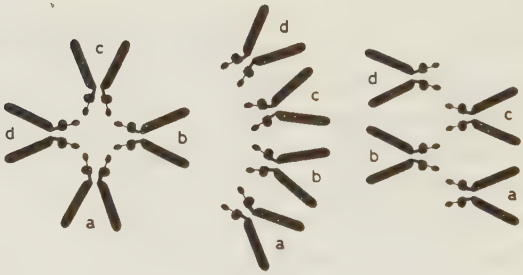

Abb. 2+): Die mögliche Anzahl von Assoziationen zwischen vier akrozentrischen Chromosomen. A: Die Gruppe a-b, a-c, a-d, b-c, b-d, c-d = 6 Möglichkeiten. B,C: Die Reihe: a-b, b-c, d-c = 3 Möglichkeiten.

+) Die Abbildungen entstammen der Arbeit: von ZANG und BACK erschienen in Cytogenetics 7:455-470 (1968)

Abb. 3: Plazentafibroblasten-Mitose, die 5 akrozentrische Chromosomen in Assoziation zeigt: D-D; DGG (DG, DG, GG). Ein Paar: DD und eine Gruppe DGG (DG, DG, DGG).

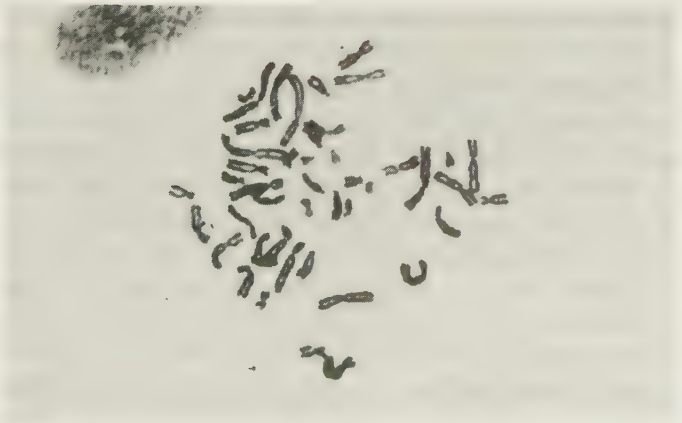

Abb. 4: Plazentafibroblastenmitose, die 4 akrozentrische Chromosomen in Reihe assoziiert zeigt: D-G-G-D (DG,GG,GD).

Hilfe der mikroskopischen Kontrolle. Dieser doppelte Untersuchungsgang war notwendig, um subjektive Einflüsse bei der Beurteilung weitgehend auszuschalten.

Durchgeführte Berechnungen

Unsere Untersuchungen wurden in ähnlicher Weise ausgewertet, wie ZANG und BACK (1968) die Lymphozytenkulturen untersucht hatten. Mit deren Ergebnissen wurden unsere Werte abschliessend verglichen.
Uns interessierte, wie sich Gewebs- und Präparationsunterschiede beider Kulturen in Häufigkeit, Gruppierungen und qualitativen Faktoren der Assoziationen akrozentrischer Chromosomen niederschlugen.
Da die Stichprobengröße materialbedingt pro Fall leider sehr unterschiedlich ausfiel, entschlossen wir uns, die Werte auf einen Standard von 50 Mitosen pro Fall umzurechnen.
Wir berechneten:

1. Die Assoziationshäufigkeit, die wir durch den Prozentsatz an Zellen mit selbständigen Assoziationskomplexen ausdrückten, d.h. in wievielen Zellen wir überhaupt Assoziationen gefunden haben.
2. Der Gruppenindex. Er ist definiert als Assoziationen pro Mitose, d.h. wieviel selbständige Assoziationskomplexe findet man pro Mitose.
3. Der Paarindex. Zerlegt man die Assoziationskomplexe in alle miteinander assoziierten Chromosomenpaare (siehe auch Abschnitt Assoziationskriterien Abb. 2), und berechnet dann den Quotienten assoziierte Paare pro Mitose, so erhält man den Paarindex.
   (Findet man in einer Population nur kleine Gruppen, z.B. nur Paare, so werden Gruppen- und Paarindex annähernd gleich sein. Je größer aber die Chromosomengruppen werden, und je häufiger sie auftreten,

desto weiter werden sich die beiden Indices voneinander entfernen.) So sind sie ein guter Maßstab für die Assoziationsdichte.

4. Ähnliches sagt der Index Anzahl Chromosomen pro Assoziation aus. Sein Minimalwert beträgt 2,0 (bei einem Paar) und maximal könnte er 10,0 erreichen, wenn alle akrozentrischen Chromosomen in einem Komplex assoziiert wären.
5. Der Quotient assoziierte D- zu assoziierten G-Chromosomen. Jedes der akrozentrischen Chromosomen hat theoretisch dieselbe Möglichkeit in Assoziation zu treten. Bei sechs D- und vier G-Chromosomen ist daher das theoretisch zu erwartende Verhältnis 1,5. Bei einer rein männlichen Population könnte er durch die Teilnahme des Y-Chromosoms an den Assoziationen etwas niedriger liegen. Durch diesen Quotienten kann man die Frage klären, ob D- und G-Chromosomen nach Zufall verteilt an Assoziationen teilnehmen oder ob eine von beiden Gruppen bevorzugt wird.
6. Die relative Verteilung von DD-, DG- und GG-Assoziationen zueinander, für die wir ein theoretisch zu erwartendes Verhältnis von 15:24:6 berechnen und mit den beobachteten Quotienten vergleichen können.

Bei dem statistischen Vergleich unseres teilweise recht unterschiedlichen Zahlenmaterials hatten wir es mit "diskreten" Einzelwerten und nicht mit "kontinuierlichen" Werten zu tun. Für die Signifikanz-Berechnung ist deshalb die Anwendung eines T-Tests nur bedingt zulässig; für den Vergleich der beiden Populationen gibt er jedoch wertvolle Informationen. Zur Statistik bestimmten wir:

1. Die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Stichproben.
2. Die Standardabweichung $SD = \sqrt{\frac{(x-\bar{x})^2}{n-1}}$, die ausdrückt, wieweit in den einzelnen Gruppen die verschiedenen Werte um den Mittelwert streuen.

3. Der Standardfehler (SE), der den Vertrauensbereich absteckt, in dem der wahre Mittelwert zu finden ist.
4. Unterschiede in der Verteilung der DD-, DG- und GG-Assoziationen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2-Test) erfaßt. Mit ihm kann man die Übereinstimmung empirischer und theoretisch zu erwartender Verteilungen prüfen. Durch ihn konnten wir errechnen, inwieweit die beobachteten Werte für DD-, DG- und GG-Assoziationen mit den theoretisch berechneten übereinstimmen, oder ob sie sich signifikant von ihnen unterscheiden. Dieser Test wurde auch zur Erfassung individueller Unterschiede verwendet.

B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E

Insgesamt untersuchten wir 1385 Fibroblastenmitosen von denen 799 von 17 reifen menschlichen Plazenten und 586 von 13 Hautbiopsien stammten. Die beiden Populationen untersuchten wir getrennt voneinander unter folgenden Gesichtspunkten:

1. Quantitative Untersuchungen
   a) Prozentuale Häufigkeit von Mitosen mit Assoziationen
   b) Häufigkeit von Assoziationskomplexen pro Mitose
   c) Durchschnittliche Gruppengröße
   d) Gruppenverteilung auf die einzelnen Mitosen
   e) Die Anzahl der Chromosomen pro Assoziationen
2. Verteilung der DD-, DG- und GG-Assoziationen. (Hier untersuchten wir die assoziierenden Chromosomen auf ihre Kombinationen, deren Häufigkeit und ihre Übereinstimmung mit den theoretisch zu erwartenden Werten.)
3. Individuelle Unterschiede

<u>ad 1:</u> AAC-Häufigkeiten und Gruppengrößen.

Der durchschnittliche Prozentsatz an Zellen, die Assoziationen akrozentrischer Chromosomen enthalten, ist in Tabelle 1 angegeben. Hier zeigt sich schon der große Unterschied zwischen beiden Zelltypen. Während die Plazentapräparate in über der Hälfte aller Mitosen (59,7 $\pm$ 8,8 %) Assoziationsfiguren zeigen, sind diese bei den Hautkulturen nur in einem Drittel aller Mitosen (33,1 % $\pm$ 7,2) zu finden. Die Streuung unterscheidet sich bei beiden nicht auffällig. Die Werte für die einzelnen Fälle sind in Tabelle 13 im Anhang angegeben. Die individuelle Variationsbreite liegt bei den Plazentakulturen zwischen 37,9 und 70,8 % und zwischen 24,4 und 45,4 % bei den Hautkulturen.

Tabelle 1: Das Auftreten von Assoziationen im Durchschnitt bei beiden Populationen.

	unters. Mitosen	Zellen mit AAC $\bar{x}$	SD	Chromosomen pro Assoz.	Assoz. pro Mitose
Plazentapräparate	799	59,7%	± 8,8	2,25	0,85
Hautkulturen	586	33,1	± 7,17	2,05	0,39

Noch deutlicher wird der Unterschied, wenn man den Index Assoziationskomplex pro Mitose (Gruppenindex) betrachtet. Er beträgt für die Plazentafibroblasten 0,75 und für Hautfibroblasten nur die Hälfte (0,37). Wenn nun die Assoziationsreihen und -gruppen in ihre jeweils assoziierten Paare zerlegt werden (siehe Methodik), dann steigt der Index (Paarindex) auf 0,85 bei Plazenten, während er bei Haut mit 0,39 fast gleich bleibt.
Dies zeigt, daß bei dem Plazentagewebe wenig und bei dem Hautgewebe fast keine Assoziationen von Gruppen mit mehr als zwei Chromosomen auftraten.

Diese Unterschiede treten auch in Tabelle 2 klar hervor. Hier werden die Häufigkeiten der einzelnen Gruppen und Paare beider Arten von Fibroblastenkulturen mit ihren Mittelwerten, Standardabweichungen und Standardfehlern verglichen.
Während Dreiergruppen bei den Plazentapräparaten in ca. 9 % auftreten, sind sie bei den Hautkulturen nur in etwa 2 % vorhanden. Ebenso vermindern sich die durch "Brücken" fixierten Paare von 10 % auf 5 %.

Auffällig ist hier die relativ hohe (gegenüber den anderen) Standardabweichung (± 11,2 Assoziationen) der "Gesamtzahl der Paare" innerhalb der Plazentafibroblasten, während der Mittelwert (41,2) nicht stark von dem der "Gruppen" abweicht.

Tabelle 2: Vergleich der Assoziationen akrozentrischer Chromosomen von Plazenta- und Hautgewebe.

	n[2/]	auf 100[1/] umgerch.	$\bar{x}$	SD	SE
	Plazentapräparate			17 Fälle	
Gruppen von 2 Chromosomen	543	67,2	33,6	5,4	1,3
Gruppen von 3 Chromosomen	51	6,6	3,92	1,9	0,5
Gruppen von 4 Chromosomen	8[3]				
Gesamtzahl der Gruppen	602	75	37,5	6,4	1,5
Gesamtzahl der Paare	678	87,6	41,2	11,2	2,8
Gesamtzahl der durch Brücken fixierten Paare	61	7,2	3,9	2,2	0,5
	Hautkulturen			13 Fälle	
Gruppen von 2 Chromosomen	215	36,7	18,4	4,1	1,2
Gruppen von 3 Chromosomen	4[3]				
Gruppen von 4 Chromosomen	1[3]				
Gesamtzahl der Gruppen	220	37,5	18,8	4,1	1,1
Gesamtzahl der Paare	226	38,5	19,2	4,3	1,2
Gesamtzahl der durch Brücken fixierten Paare	12[3]				

n = Gesamtzahl der gefundenen Häufigkeiten
1/ Anzahl der Assoziationen pro 100 Mitosen
2/ Die statistischen Berechnungen wurden von den auf 50 Mitosen umgerechneten Rohwerten vorgenommen (siehe auch Tabellen im Anhang).
3/ Bei diesen niederen Werten erübrigte sich eine weitere statistische Auswertung.

Tabelle 3: Der Prozentsatz von unabhängigen AAC-Gruppen pro Mitose

	unters. Mitosen	Anzahl der SA pro Zelle in % 0	1	2	3
Plazentapräparate	799	37,8	40,9	19,5	1,8
Hautkulturen	586	72,5	22,8	4,5	0,18

Sieht man sich dazu Tabelle 10 im Anhang an, so zeigt Spalte 5 eine individuelle Variationsbreite bei den "Paaren" zwischen 48,2 und 121,8 Assoziationen pro 100 Mitosen, während diese bei den "Gruppen" wesentlich geringer ist. Die hohe Standardabweichung bei den "Paaren" beruht also fast ausschließlich auf einer höheren bzw. geringeren Anzahl von Mehrfachassoziationen bei einigen Individuen.

Theoretisch besteht eine große Zahl von Kombinationsmöglichkeiten für die Assoziationen bildenden Chromosomen. Komplexe von vier Chromosomen traten nur noch achtmal bei den Plazentafibroblasten, bei den Hautfibroblasten nur noch einmal auf. Größere Gruppierungen sahen wir bei beiden Populationen nicht.

Dies bekräftigt der Index: Anzahl der Chromosomen pro Assoziation. Er beträgt 2,25 bei dem Plazentagewebe und nur 2,05 bei dem Hautgewebe (Tabelle 1).

Maximal können alle zehn akrozentrischen Chromosomen an Assoziationen teilnehmen. Wie zu erwarten, waren bei unserem Material größere Beteiligungen selten. Bei den Plazentapräparaten nahmen siebzehnmal 5, vierzehnmal 6 und einmal 7 Chromosomen an Assoziationen teil. Bei den Hautpräparaten dagegen fanden wir nur einmal sechs Chromosomen in Assoziationskomplexen einer Zelle, während nie fünf oder sieben Chromosomen beteiligt waren. Aus diesem Grunde sind auch bei Aufschlüsselung der Anzahl unabhängiger AAC-Gruppen pro Zelle vermehrt kleine Gruppen zu finden (Tabelle 3).

ad 2: Die Verteilung der D- und G-Chromosomen in den AAC

Die Verteilung der Assoziationen auf die DD-, DG- und GG-Paare ist in Tab. 4 aufgeführt. Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zeigen keine Besonderheiten. Die Verteilung dieser Gruppierung ist in beiden Populationen ziemlich gleichmäßig. Um etwas über die Neigung der D- und G-Chromosomen,mit der sie an Assoziationen teilnehmen, zu erfahren, be-

Tabelle 4: Vergleich der Anzahl von DD-, DG-, GG-Assoziationen von Haut- und Plazentapräparaten.

	n	auf 100 umgerch.	$\bar{x}$	SD	SE
		Plazentapräparate			
Summe der D-D Assoziat.	206	26,3	13,2	5,6	1,4
Summe der D-G Assoz.	345	44,2	21,3	7,4	1,8
Summe der G-G Assoz.	127	16,7	8,4	3,5	0,9
		Hautkulturen			
Summe der D-D Assoz.	65	11,1	5,6	1,8	0,5
Summe der D-G Assoz.	123	20,7	10,4	4,7	1,3
Summe der G-G Assoz.	38	6,6	3,3	2,4	0,7

stimmten wir den Quotienten aus assoziierenden D- und G-Chromosomen (D_{AS} : G_{AS}): Tabelle 6.

Wie schon erwähnt, beträgt der theoretisch zu erwartende Wert dieses Quotienten 1,5.

Bei den Plazentapräparaten weicht der Quotient deutlich vom Erwartungswert ab (1,28 $\pm$ 0,39). Er geht hier in Richtung 1, d.h. in Richtung einer gleichen Häufigkeit assoziierender D- und G-Chromosomen, trotz ihrer unterschiedlichen Anzahl. Bei den Hautpräparaten nähert sich der Quotient mit 1,46 ganz dem Erwartungswert. Er hat aber eine auffallend höhere Standardabweichung ($\pm$ 0,9).

Ob nun die D- oder G-Chromosomen für die Verschiebung des Quotienten verantwortlich sind, zeigt uns die Verteilung der DD-, DG- und GG-Assoziationen.

Aufgrund der Anzahl von sechs D- und vier G-Chromosomen in jeder Mitose, errechnet sich (siehe Methode) die theoretische Verteilung DD : DG : GG wie 15 : 24 : 6. Eine Methode, die erwarteten Ergebnisse mit den beobachteten zu vergleichen, ist der Chi-Quadrat-Test in Tabelle 5.

Tabelle 5: Beziehung zwischen D-D, D-G und G-G Assoziationen.

		D-D (0,3$\bar{3}$)	D-G (0,5$\bar{3}$)	G-G (0,1$\bar{3}$)	χ^2	P(df=2)
Plazenta-präparate	beob.	206	345	127		
	erwart.	224	360	88		
	χ^2	1,5	0,6	17,3	20,4	P 0,005
Hautkulturen	beob.	65	123	38		
	erwart.	75	120	30		
	χ^2	1,3	0,1	2,1	3,5	P 0,2

Die gefundenen DD-Paare waren geringgradig vermindert, die DG-Häufigkeiten entsprachen einander, während die beobachteten GG-Paare deutlich über den Erwartungswerten lagen. Es zeigt sich eine deutliche Verschiebung der Assoziationsneigung zu den GG-Paaren hin. Dies bringt auch der Quotient D_{AS} : G_{AS} zum Ausdruck. Der Unterschied ist bei den Plazentakulturen signifikant mit $P < 0{,}005$. Bei den Hautkulturen sind als Trend die gleichen Abweichungen feststellbar, aber statistisch nicht signifikant. Als Nebenbefund beobachteten wir in zwei Plazentakulturen Mitosen mit deutlich assoziiertem Y-Chromosom. In einem Fall war es ein Marker-Chromosom.

Tabelle 6: Der D/G Quotient

	Assoziierte D	G	D_{AS}	G_{AS}
Plazentapräparate			x	SD
	757	599	1,28	± 0,39
Hautkulturen	253	199	1,46	± 0,9

Die individuellen Werte siehe Tabellen 13 u. 14 im Anhang.

ad 3: Individuelle Unterschiede

Um Unterschiede in der Häufigkeit der Assoziationsmuster und im Verhältnis der DD-:DG-:GG-Gruppierungen auch für die einzelnen Fälle statistisch belegen zu können, wandten wir den vorher für die Gesamtheit durchgeführten Chi-Quadrat-Test für die einzelnen Individuen an (Tabelle 7).

Damit dieser Test aber statistische Aussagekraft bekommt, müssen die absoluten Häufigkeiten bei den Erwartungswerten mindestens 5 betragen (siehe HASELOFF-HOFFMANN).
Dies erfüllten bei den Plazentafibroblasten nur die nicht in Klammern gesetzten Fälle. Alle Einzelwerte der Hautkulturen genügen dieser Forderung nicht. Hier läßt nur die Summe eine einwandfreie statistische Bewertung zu.

Die Summenwerte sowohl bei den Plazentafibroblasten (Chi-Quadrat = 79,55 mit $P < 0{,}005$) als auch bei den Hautfibroblasten (Chi-Quadrat = 42,86 mit $P < 0{,}01$) unterscheiden sich signifikant vom Erwartungswert. Bei dem Plazentagewebe wichen sechs Fälle bereits als Einzelwerte signifikant (obere Signifikanzgrenze: $P < 0{,}05$) von den theoretischen Werten ab. In drei Fällen geschah dies vor allem aufgrund des Ansteigens der GG-Assoziationen. Die anderen zwei Fälle zeigten die Unterschiede vor allem in ihren DD, aber auch einmal in ihren DG-Assoziationen.
Insgesamt zeigt sich bei diesem Gewebe stärker als bei dem Hautgewebe eine Vermehrung der GG-Assoziationen. Die DG-Gruppen entsprechen meist den Erwartungswerten. Während die DD-, wenn sie von den Erwartungswerten abwichen, mit wenigen Ausnahmen vermindert waren.

Um aber auch die Hautkulturen auf individuelle Unterschiede untersuchen zu können, führten wir mit dem Quotienten D_{AS} : G_{AS}, dessen erwartetes Verhältnis 3:2 beträgt, den Chi-Quadrat-Test durch.

In diesem Fall zeichnet die Methode durch Verminderung der Unterscheidungsmöglichkeiten von drei auf zwei natürlich ein ungenaueres Bild als der vorhergehende Test.

Tabelle 7: Individuelle Verhältnisse in der Beziehung der einzelnen Assoziationspaare D-D, D-G, G-G.

Plazentapräparate						Hautkulturen					
Fall	χ^2_{DD}	χ^2_{DG}	χ^2_{DG}	χ^2	P	Fall	χ^2_{DD}	χ^2_{DG}	χ^2_{GG}	χ^2	P
G 1	1,84	0,14	9,47	11,45	0,005	F 123	0,13	0,07	0,03	0,3	
(G 2	0,24	1,66	3,88	5,78)		F 125	2,3	0,1	3,5	7,9	
G 3	1,59	1,59	0,02	3,2		F 128	3,2	0,5	1,7	5,4	
G 4	3,64	0,14	3,48	7,26	0,05	F 132	0,5	0,1	3,5	4,1	Einzel-
G 5	3,95	2,85	0,17	6,97	0,05	F 133	0,7	0,5	0,01	1,21	bewertung
G 6	2,09	3,31	1,28	6,68	0,05	F 134	0,02	1,2	6,5	7,72	unzuläs-
G 7	0,85	0,53	9,54	10,92	0,005	F 135	0,7	0,03	0,7	1,43	sig, da al
G 8	0,08	0,47	1,22	1,77		F 138	1,0	0,02	2,2	3,22	Erwartungs-
G 9	1,63	0,63	0,06	2,32		F 139	1,5	3,4	2,9	7,8	werte zu
G 10	0,23	0,05	0,2	0,48		F 141	0,6	1,0	2,2	3,8	gering
G 11	1,08	0,08	6,9	8,06	0,05	F 142	0,0	0,1	0,6	0,7	
G 17	0,0	0,34	1,71	2,05		F 146	0,1	0,4	0,4	0,9	
G 20	0,55	0,72	0,12	1,39		F 148	0,02	0,03	0,4	0,45	
(G 21	0,17	0,0	0,51	0,68)							
G 22	2,45	0,41	1,9	4,76		Summe	10,77	7,45	24,64	42,86	0,01
[1](G 24	0,08	0,05	0,02	0,15)							
(G 33	0,1	1,43	4,1	5,63)							
Summe	20,57	14,40	40,58	79,55	0,005						

[1]Die in Klammern gesetzten Fälle kommen wegen zu kleiner Erwartungswerte (< 5) für die individuelle Bewertung nicht in Frage.

Signifikanzgrenzen: Einzelkorrelationen: $\chi^2 = 6,0$ (P = 0,05; df = 2); $\chi^2 = 9,2$ (P = 0,01; df = 2). Grenze für die Summe: Plazentapräparate: $\chi^2 = 48,6$ (P = 0,05; df = 34) $\chi^2 = 56,1$ (P = 0,01; df = 34). Hautkulturen: $\chi^2 = 38,88$ (P = 0,05; df = 26); $\chi^2 = 45,64$ (P = 0,01; df = 26).

Diese Vergröberung der Aussage wird klar, wenn wir die Chi-Quadrate der Plazentapräparate von Tabelle 7 mit denen von Tabelle 14 vergleichen. Nur die deutlich abweichenden Werte zeigen auch in diesen Tests Signifikanz.
Bei den Hautkulturen (Tabelle 15) weichen nur in zwei Fällen (F 125 und F 128) die Verteilung der Assoziationen signifikant ($P < 0,05$) vom Erwartungswert ab. Der erste, F 125, zeigt vermehrt G-Chromosomen assoziiert, während der andere ein Ansteigen der assoziierten D-Chromosomen bringt. Dies spiegelt sich auch deutlich im Quotienten $D_{AS} : G_{AS}$ (0,7 bzw. 4,2) wider. Der letztere Quotient ist um fast das Dreifache des Erwartungswertes erhöht und scheint hauptsächlich für den hohen Mittelwert (1,46) dieses Quotienten bei den Hautkulturen verantwortlich zu sein. Ohne diesen Fall (F 128) korrespondiert auch der $D_{AS} : G_{AS}$-Mittelwert der Hautkulturen (1,23) gut mit dem der Plazentapräparate.

D I S K U S S I O N

1. Quantitative Unterschiede und ihr Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren

FRØLAND und MIKKELSEN (1964) und PROKOFIEVA-BELGOVASKAYA (1968) waren bisher die einzigen, die Fibroblastenmaterial studiert hatten. Sie verglichen dies mit Material anderen Zelltyps. Wir hingegen untersuchten Fibroblastenchromosomen unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlicher Präparation.

FRØLAND und MIKKELSEN zeigten als erste Unterschiede in der Assoziationshäufigkeit bei Zellen verschiedenen Typs. Sie fanden bei Hautfibroblasten 0,49 und bei Lymphozyten 1,32 Assoziationen pro Zelle. In weitgehender Übereinstimmung dazu sind die Werte von PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA (1968) mit 0,35 für embryonale Fibroblasten und 1,46 für Lymphozyten von Jugendlichen.

Von unserem Material korrespondieren die Hautfibroblasten mit 0,37 Assoziationen pro Mitose gut mit diesen Ergebnissen, während die Plazentafibroblasten mit 0,75 deutlich erhöht sind. Vergleicht man aber letzteren Wert mit dem, von PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA als Assoziationshäufigkeit ihrer Neugeborenen (0,63 AAC pro Mitose) angegebenen, so stimmen beide gut überein.

Interessant ist die Übersicht über die in der Literatur von einer Reihe von Autoren angegebenen Prozentzahlen von Mitosen mit Assoziationen akrozentrischer Chromosomen (Tab. 8). Dabei fallen deutlich unsere Plazentafibroblasten heraus. Ihr Wert (59,7%) liegt deutlich näher bei den Blut- als bei den Kulturen gleichen Gewebetyps.

Auch der Vergleich von Gruppen- und Paarindices ist sehr aufschlußreich. ZANG und BACK (1968) geben für ihre Lymphozytenkulturen, die nach der Makrokultur-Methode von MOORHEAD (1960) als Serie A präpariert wurden, 1,62 Assoziationen pro

Tabelle 8: Vergleich des prozentualen Anteils der Zellen mit AAC an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen bei verschiedenen Autoren.

Zahl der unters. Zellen	% der Mitosen mit AAC	Autoren
		Lymphozytenkulturen
250	60	Ferguson-Smith und Handmaker 1961
32	73	Shaw 1961
1000	96,6	Cohen und Shaw 1967
1550	73,3	Mikrokulturmethode Zang und Back 1968
1300	88,1	Makrokulturmethode
1235	68,4	Prokofieva-Belgovskaya 1968
1100	70,5	Hansson 1970 a
1762	81,7	Hemel 1971
		Fibroblasten
246	30,5	Prokofieva-Belgovskaya 1968
799	59,7	Plazentafibroblasten dieser Arbeit
586	33,1	Hautfibroblasten dieser Arbeit

Mitose als Gruppenindex und 2,37 als Paarindex an. Bei Serie B, die nach der Mikrokultur-Methode von ARAKAKI und SPARKES (1963) angefertigt worden waren, vermindern sich die Indices auf 1,09 bei den Gruppen und 1,37 bei den Paaren. Bei unseren Untersuchungen beträgt der Gruppenindex bei den Plazenten 0,75 und bei dem Hautgewebe 0,37, und der Paarindex 0,85 bzw. 0,39. ZANG und BACK (1968) fanden in Serie A fast das Doppelte an Gruppen und fast das Vierfache an Paaren, im Gegensatz zu unserem Plazentagewebe, während sie nur ca. 28 % mehr Zellen mit Assoziationen fanden. In Serie B, den Mikrokulturen, tritt dieser Unterschied nicht so deutlich hervor.

Wenn man sich nun die Gruppenverteilungen in Tab. 9 und Tab. 11 ansieht, so zeigt sich, daß wir vor allem weniger große Gruppen gefunden haben. Diese Verminderung der Mehrfach-Assoziationen geben, nur nicht so ausgeprägt, auch ZANG und BACK (1968) beim Vergleich ihrer Serien A und B an. Theoretisch wäre anzunehmen, daß eine Verringerung der Assoziationen Gruppen aller Größen gleichmäßig betrifft. Bei unseren Fibroblasten aber werden nicht gleichmäßig alle Gruppen von der Verminderung betroffen, sondern sie geht hauptsächlich auf Kosten der Mehrfach-Assoziationen und größeren Komplexe. Man kann annehmen, daß die Zunahme der Assoziationen bei den Blutkulturen weniger durch Auftreten von Assoziationen in weiteren Zellen als vielmehr durch Anwachsen der AAC-Komplexe in den gleichen Mitosen bedingt ist, bzw. daß je nach Präparationsverfahren mehr oder weniger viele der größeren Assoziationskomplexe zerstört werden.

2. Qualitative Unterschiede

Weitaus stabiler ist die relative Verteilung auf DD-, DG- und GG-Assoziationen. Die hier gefundenen Abweichungen von den Erwartungswerten bestätigen, wenn auch zahlenmäßig verschieden, andere Veröffentlichungen, die Lymphozyten-Kulturen betreffen (ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969, HANSSON 1970 a).
Das Verhältnis DD zu DG zu GG sollte theoretisch 15:24:6 sein. Bei den Plazenta-Fibroblasten entsprechen lediglich die DG-Paare dem erwarteten Wert. Die "DD" weichen gering nach unten ab, während bei den "GG" die beobachteten Werte sehr deutlich erhöht sind. Dies läßt sich mit geringerem Signifikanz-Niveau auch bei den Haut-Fibroblasten nachweisen. Die Erhöhung der GG-Gruppen fanden an Lymphozytenkulturen auch ZANG und BACK (1968), ROSENKRANZ und FLECK (1969), HANSSON (1970 a) und VAN HEMEL (1970). ZANG und

BACK hielten dies für einen präparatorischen Effekt. Sie glaubten, daß kleinere Chromosomen weniger mechanischen Einflüssen ausgesetzt sind, weil sie eine geringere Angriffsfläche bieten. Deshalb könnten größere leichter von einander getrennt werden. Erstaunlicherweise bleibt dieser Effekt in so verschiedenen Zelltypen und nach so verschiedenen Präparations-Methoden erhalten.

Zusätzlich bestimmten wir noch den Quotienten (D_{AS} : G_{AS}), dessen theoretischer Wert 1,5 betragen müßte. Für Lymphozytenkulturen bestimmte REITALU (1964) ihn mit 1,0, während COHEN und SHAW (1967) 1,2 und HANSSON (1970 a) 1,3 angeben. Aus den Werten von ZANG und BACK errechnet sich ein Durchschnitt von 1,3. Unser Wert für Plazentafibroblasten beträgt 1,28 und korrespondiert damit gut mit den Lymphozyten-Werten. Auch hier zeigt sich die stärkere Assoziationsneigung der G- gegenüber den D-Chromosomen. Der Chi-Quadrat-Test zeigt, daß die Verschiebung der Assoziations-Häufigkeit ganz zu Lasten der GG- und DD-Paare geht, während die "DG" unbeeinflußt bleiben (Tabelle 5).
Das sich bei den Hautkulturen mit 1,46 mehr dem theoretischen Erwartungswert nähernde Verhältnis ist ganz von Fall 128 mit einem Verhältnis von 4,2 geprägt und demzufolge nur schwer zu beurteilen. Dies zeigt auch die hohe Standardabweichung mit $\pm$ 0,9, die bei einem Zahlenwert von 1,5 die Mittelwertbildung im Rahmen dieser Population als unverwertbar erkennen läßt. Klammert man dagegen den Fall 128 bei der Berechnung dieses Verhältnisses aus, so erhält man einen Mittelwert von 1,23 der gut mit den oben angegebenen korrespondiert.

3. Individuelle Unterschiede

Unsere Fibroblastenkulturen, besonders die von Plazenten, zeigen deutliche individuelle Muster. Bei dem Hautgewebe sind durch die starke Verminderung der assoziierenden Chro-

mosomen die Unterschiede geringer, aber ebenfalls feststellbar. Sie werden vor allem in der hohen Streuung des D_{AS}/G_{AS}-Quotienten sichtbar. Da die gefundenen Häufigkeiten sehr gering sind, werden die Differenzen nur selten statistisch signifikant. Ein weiterer Grund für diese geringen Unterschiede, die beim D_{AS}/G_{AS}-Quotienten gefunden wurden, ist die Tatsache, daß man bei diesem Test gegenüber dem Chi-Quadrat-Test eine Unterscheidungsmöglichkeit außer acht läßt, nämlich die DG-Kombinationen. So wird nur das Verhältnis assoziierter D- zu G-Chromosomen untersucht, nicht das Verhalten der einzelnen Paare zueinander. Trotzdem ist dieser Test eine wertvolle Ergänzung, wenn der Chi-Quadrat-Test für die Differenzierung von drei Gruppen wegen zu geringer Häufigkeiten versagt.
Studiert man nun die Verteilung der paarweisen Assoziationen, auf die einzelnen Individuen (Tab.10 im Anhang), so zeigt sich, daß die hohe Streuung allein durch einige wenige Individuen bedingt ist, die einen bedeutend höheren Anteil an Paaren und Mehrfachassoziationen haben.

Auf der anderen Seite zeigt Tab. 7, daß die hohe Abweichung der GG-Assoziationen zum größten Teil ebenso zu Lasten einiger bestimmter Fälle geht, die damit die gesamte Verteilung beeinflussen (siehe auch ZANG und BACK 1968).
Die Fälle, die vermehrt größere Assoziationskomplexe haben, sind bei unserem Material aber nur in zwei Fällen identisch mit denen, die eine starke Zunahme der GG-Assoziationen zeigen. Für prinzipielle Aussagen ist unser Material relativ klein. Vergleicht man es aber mit den an Lymphozyten gewonnenen Ergebnissen anderer Autoren (VAN BRINK 1962, COHEN und SHAW 1967, ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969), so zeigt sich trotzdem, daß die Abweichungen der an Assoziationen teilnehmenden D- und G-Chromosomen von der Erwartungsverteilung nicht nur von einer in diesen Fällen erhöhten Anzahl von Paaren und besonders von Mehrfachassoziationen abhängt. Sie scheinen vielmehr Ausdruck eines dem Individuum eigenen Assoziationsmusters zu sein.

Ob dies auch Ausdruck einer Genfunktion ist, ist noch nicht ganz klar. Dies würde mit der Hypothese von ZELLWEGER und ABBO (1966) übereinstimmen, die bei Familien mit chromosomalen Mosaikbildungen ein gehäuftes Auftreten von Assoziationen akrozentrischer Chromosomen gefunden hatten. Dafür diskutierten sie ein diese Chromosomenverklebung auslösendes Gen, das Ursache einer postmeiotischen "Non-disjunction" sein könnte. Die seinerzeit von ZELLWEGER aufgrund von Familienbefunden aufgestellte Hypothese, scheint sich heute durch biochemische Ergebnisse zu bestätigen, nachdem gefunden wurde, daß an den sekundären Konstriktionen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen die r-DNS lokalisiert ist, die allein die ribosomale RNS der Nukleolen zu bilden vermag (HSU et al. 1967). Es ist denkbar, daß es in Funktion und Aktivität der Nukleoli Unterschiede zwischen den Individuen gibt, die sich dann in morphologisch erkennbaren Veränderungen des Assoziationsmusters ausdrücken. Eine Beziehung zwischen Nukleolus und Assoziation zeigten HOEHN et al. (1971), die durch chemische Agenzien den Aktivitätszustand des Nukleolus veränderten und damit die Assoziationsrate beeinflußten. BENSON (1967) konnte beim Down-Syndrom eine Erhöhung der RNS- und Proteinsynthese der Lymphozyten in vitro zeigen, was auch auf eine Veränderung der Nukleolusgröße schließen läßt. Es ist auch denkbar, daß durch eine "spontane" Aktivitätsveränderung bedingt, der Nukleolus sich später auflöst. Dadurch werden die Chromosomen länger zusammengehalten und es treten dann vermehrt AAC auf bzw. bleiben erhalten (ROSENKRANZ und FLECK 1969). Durch pathologisches Persistieren des Nukleolus und eine erhöhte "Klebrigkeit" (OHNO 1961, HSU 1965) könnte eine normale Zellteilung gestört werden und aneuploide Chromosomensätze entstehen.

4. Die in allen Berechnungen aufgetretenen Häufigkeitsunterschiede

Bei allen unseren Berechnungen fallen immer wieder die starken Unterschiede in den Assoziationshäufigkeiten der einzelnen von uns untersuchten Populationen auf. Auf der einen Seite die Hautfibroblasten, deren Ergebnisse gut zu denen anderer Arbeiten über Fibroblastengewebe passen. Sie zeigen außer starker Verminderung der Assoziationshäufigkeit gegenüber Lymphozyten keine großen Besonderheiten. Auffällig sind dagegen die Plazentafibroblasten. Ihre Assoziationshäufigkeiten unterscheiden sich von den "gewebeverwandten" Fibroblasten weit stärker als z.B. von den "gewebefremden" Lymphozyten. Für diese Besonderheit gibt es nun eine Reihe von prinzipiellen und systembedingten Erklärungsmöglichkeiten:

1. Geschlechtsunterschiede. Durch die ungleiche Geschlechtsverteilung unserer Populationen hätten unsere Ergebnisse beeinflußt sein können. Aber in der Mehrzahl der Publikationen konnten bisher keine geschlechtsbedingten Differenzen gefunden werden (FRØLAND und MIKKELSEN 1964, COHEN und SHAW 1967, ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969). Die manchmal gefundenen Unterschiede sind bei allen Veröffentlichungen sehr gering und konnten unsere Ergebnisse nicht in diesem Ausmaß beeinflussen.

2. Unterschiedliche Beurteilungskriterien. Sie haben bei unseren Vergleichen keinen wesentlichen Einfluß, da COHEN und SHAW (1967), ZANG und BACK (1968), LUCHSINGER et al. (1969), HANSSON (1970 a) und diese Arbeit dieselben Bewertungsgrundsätze verwendet haben. Die von PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA et al. (1968) angewandten Assoziationskriterien unterscheiden sich zwar etwas von den unseren, können aber auch nicht das Ausmaß der gefundenen Differenzen erklären.

Auch wenn nach denselben Maßstäben bewertet wird, ergeben sich zwischen verschiedenen Untersuchern sicher etwas unterschiedliche Ergebnisse, da manchmal schwierig zu deutende räumliche Anordnungen der Chromosomen auftreten, die dann eine unterschiedliche Interpretation zulassen. Aus diesem Grund führten wir eine zusätzliche Kontrolluntersuchung durch, die - wie schon erwähnt - in etwa 3 % aller Assoziationen Differenzen erbrachte.

3. Die Präparationstechnik. ZANG und BACK (1968) schreiben: "Unsere heutige Präparationstechnik ist in keinem Fall optimal.... Was wir an Satellitenassoziationen sehen, ist das absolute Minimum, das nach den verschiedenen Eingriffen, um die Chromosomen zu spreiten, noch übrigbleibt".
   Auf den ersten Blick glaubt man hier den Grund für die Häufigkeitsunterschiede zwischen Plazentapräparaten und Hautpräparaten gefunden zu haben. Bei der Präparation der Plazentapräparate wurde kein Colzemid verwendet. Dieses greift bekanntlich am Spindelapparat an und zerstört ihn. Dadurch wird die Zellteilung in der Metaphase blockiert und wir erhalten mehr und besser auswertbare Mitosen. Da man annimmt (siehe Einleitung), daß die Anordnung der Chromosomen nicht zufällig, sondern Ausdruck einer früher bestehenden festen Ordnung ist, wäre es denkbar, daß das Mitosegift Colzemid diese Verteilung beeinflußt und somit auch unsere Assoziationen. Gerade jüngste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ergaben jedoch, daß bei Chromosomenpräparaten von Lymphozytenkulturen, die mit und ohne Colzemid angefertigt worden waren, kein signifikanter Unterschied im Assoziationsverhalten gefunden wurde (HAHNER 1973). Dies ist auch verständlich, da die Assoziationen akrozentrischer Chromosomen unabhängig von einer möglichen Posi-

tionierung durch die Spindel sind. Sie kommen durch die Fusionstendenz der Nucleoli zustande, die durch Bildung der ribosomalen RNS an der r-DNS der sekundären Konstriktionen entstehen. Weiterhin kommen noch feine fädige Verbindungen zwischen den Zentromerregionen der einzelnen Chromosomen als Grund für das Persistieren der Assoziationen in Frage (DUPRAW 1970). Gerade für diese Verbindungen hat DUPRAW gezeigt, daß sie nichts mit dem Spindelapparat zu tun haben und im wesentlichen aus Nukleinsäure bestehen. Somit sind sie durch Colzemid nicht zu beeinflussen.

Im Verlauf der Präparation können die Hypotoniebehandlung, die Fixierung und die Hitzetrocknung die Zellen platzen lassen und damit Assoziationen zerstören. Diese Präparationstechniken wurden bei beiden Kulturen in etwa gleicher Weise durchgeführt. Durch verschiedene Ausführung der einzelnen Schritte können zwar Assoziationsunterschiede entstehen, die aber kaum das Ausmaß der bei uns gefundenen erreichen dürften. Eventuell wären jedoch Unterschiede in der Fütterung der heranwachsenden Kulturen als Ursache für Unterschiede der Assoziationshäufigkeit zu diskutieren, da man weiß, daß Ernährungseinflüsse den Aktivitätszustand des Nucleolus beeinflussen (HOEHN et al. 1970).

4. Das Alter des Gewebes, das zytogenetisch untersucht wird. Hier ist vor allem die Arbeit von PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA (1968) zu berücksichtigen. In unserem Fall würde ein derartiger Einfluß durch die Tatsache bestätigt, daß unsere Plazentapräparate, die altersgemäß etwa den Neugeborenen (siehe PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA (1968)) entsprechen und mit deren Neugeborenen-Blutkulturen

in den Einzelwerten recht gut übereinstimmen. Andererseits stimmen die Assoziationshäufigkeiten unserer Hautfibroblasten gut mit denen der embryonalen Fibroblasten, die PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA untersuchte, überein. Deren verminderte Assoziationszahlen begründete PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA vor allem damit, daß das embryonale Gewebe so jugendlich und undifferenziert ist. So spielt das Alter des Gewebes sicher eine Rolle aber in unserem Falle vielleicht nicht die entscheidende.

5. Unterschiedliche Organherkunft. Die von uns untersuchten Mitosen waren in beiden Fällen Fibroblasten, stammten aber von verschiedenen menschlichen Geweben (Haut und Plazenta). Dies dürfte unsere Ergebnisse wohl am Entscheidendsten beeinflußt haben. Wenn man nun die Nucleoli als die Ursache der Assoziationen akrozentrischer Chromosomen ansieht, so ergibt sich von daher eine Erklärung für die Unterschiede, die wir in den einzelnen Populationen erhalten haben. Es ist bekannt, daß in verschiedenen Geweben ein und desselben Organismus die Nucleoli oft in Größe und manchmal auch an Zahl variieren. Diese Variabilität ist oft bedingt durch die unterschiedliche RNS- und Proteinsynthese in den einzelnen Geweben. So findet man viele und große Nucleoli in Drüsenzellen und Neuronen, während Muskelzellen und sich teilende Zellen in der frühen Embryonalphase (siehe PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA) kaum Nucleoli zeigen (DUPRAW 1970). Die Planzenta ist am Ende der Schwangerschaft ein reifes und ausdifferenziertes Gewebe mit hoher Proteinsyntheseleistung und reichhaltiger Ernährung, die ja für die Nucleolusaktivität eine Rolle spielen soll. Die Haut, ebenfalls ein reifes ausdifferenziertes Gewebe, zeigt dagegen

eine verminderte Aktivität und geringere Syntheseleistung. Ganz anders transformierte Lymphozyten, die als Orte der Antikörperbildung Zellen hoher Aktivität sind. Ihre Assoziationshäufigkeiten liegen auch in ganz anderen Größenordnungen als die des Durchschnitts der Fibroblasten. Aber die Plazentapräparate und die Blutkulturen der Neugeborenen bei PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA (1968) zeigen, daß es fließende Übergänge gibt.
So scheint das Assoziationsverhalten in enger Beziehung zur Funktion des jeweiligen Ursprungsgewebes zu stehen. Die dadurch bedingten Unterschiede sind, wie unsere untersuchten Populationen und die anderer Autoren zeigen, recht deutlich. Dieses "gewebespezifische" Verhalten der Assoziationen ist aber nicht starr und zu allen Zeiten gleich und könnte durch längere in vitro-Züchtung beeinflußt werden.
Wie schon einige Arbeiten (PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA 1968, LUCHSINGER et al. 1969, MÜLLER 1971) zeigten, sind die Assoziationen ein und desselben Gewebes sehr deutlichen Altersschwankungen unterlegen. So zeigt das embryonale Fibroblastengewebe bei PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA die niedrige Assoziationsrate des undifferenzierten Gewebes mit wahrscheinlich nur geringer Nucleolusaktivität. Mit zunehmendem Alter und Differenzierung nehmen auch in der pränatalen Phase die Assoziationen zu (siehe unsere Plazenta-Präparate). In der postnatalen Phase nimmt die Assoziationshäufigkeit bei den Lymphozytenkulturen weiter zu, während in synthesearmeren nicht so aktiven Geweben, wie zum Beispiel der Haut, die Assoziationsrate entweder abnimmt oder gering bleibt. So scheinen die Assoziationen einem gewebespezifischen Lebensrhythmus zu unter-

liegen, der in Beziehung zur Funktion des Gewebes steht.
Das einem Individuum eigene Assoziationsmuster scheint dagegen in jedem Zelltyp und jedem Alter stabil zu bleiben.
Wenn man Assoziationsuntersuchungen an Abortmaterial oder an anderen Geweben durchführen will, ist es deshalb wichtig, sich über Herkunft, Alter und Zelltyp zu informieren, da nur unter Berücksichtigung dieser Faktoren vergleichende Untersuchungen in Hinblick auf eventuelle (pathologische) Abweichungen vom normalen Verhalten sinnvoll sind.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Wir untersuchten 30 Fälle von Fibroblasten-Kulturen, 17 Fälle von reifen menschlichen Plazenten und 13 von Hautgewebe gesunder Personen. Die Assoziationshäufigkeit betrug 0,75 Assoziationen pro Mitose bei den Plazenten und 0,37 bei den Hautkulturen.

Bei Plazentagewebe fanden wir 59,7 Prozent, bei Haut 33,1 Prozent Zellen mit unabhängigen Assoziationen. Die Mittelwerte und Streuungsmaße der einzelnen Gruppen und Paare zeigten gute Übereinstimmung.

Für die Verringerung der Assoziationshäufigkeit zwischen den Plazenta- und Hautgeweben einerseits und den Lymphozyten-Kulturen andererseits ist vor allem die Verminderung an Mehrfach-Assoziationen und größeren AAC-Komplexen verantwortlich.

Das Verhältnis der DD : DG : GG-Assoziationen zeigt ein statistisch signifikantes Ansteigen der GG-Assoziationen - eine Beobachtung, die auch andere Autoren bei Lymphozytenkulturen machten (REITALU 1964, COHEN und SHAW 1967, ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969, HANSSON 1970 a, HEMEL 1970). Ebenso fanden wir, besonders bei den Plazentapräparaten, individuelle Assoziationsmuster, wie sie auch bei Lymphozytenkulturen gefunden wurden (ZANG und BACK 1968, ROSENKRANZ und FLECK 1969, HANSSON 1970 a, HEMEL 1970).

Die großen Unterschiede in den Assoziationshäufigkeiten der Plazenta- und Hautkulturen einerseits und den von den anderen Autoren (s.o.) untersuchten Lymphozytenkulturen andererseits, führten wir auf den unterschiedlichen Zelltyp (Fibroblasten und Blutzellen) und auf die unterschiedliche Organherkunft (Haut und Plazenta) des von uns untersuchten Gewebes zurück.

Man glaubt heute, daß das Persistieren der Assoziationen akrozentrischer Chromosomen in enger Beziehung zu Größen und Funktionszuständen der Nucleoli steht. Da aber bekannt ist, daß in

verschiedenen Geweben ein und desselben Organismus, oft abhängig von deren Proteinsyntheseleistung, die Nucleoli an Größe und Zahl variieren können, nahmen wir an, daß das Assoziationsverhalten in enger Beziehung zur Funktion des Ursprunggewebes steht. Trotz der dadurch bedingten großen Häufigkeitsunterschiede der Assoziationen scheint aufgrund der bisher vorhandenen Ergebnisse und des hier vorgelegten Materials, das einem Individuum eigene Assoziationsmuster in jedem Zelltyp und in jedem Alter stabil zu bleiben.

T A B E L L E N D E R R O H W E R T E

PLAZENTAPRÄPARATE: Es wurden 17 Fälle untersucht. Nachfolgend die im einzelnen erhaltenen Assoziationshäufigkeiten.

Tabelle 9: Rohwerte

Fall	unters. Mitosen	Gesamtzahl der gef. Assoziationen				Zahl der mit Brücken fix. Assoziationen				Anzahl und Größe der Gruppen			
		DD	DG	GG	Summe	D-D	D-G	G-G	Summe	2	3	4	Summe
G 1	38	8	19	12	39	3	1	1	6	33	2		35
G 2	31	10	9	7	26	1	2	1	4	23	1		24
G 3	52	22	22	7	51	1	2	1	4	34	6	1	41
G 4	43	7	26	10	43		3	2	5	33	3	1	37
G 5	47	20	13	6	39		1		1	27	6		33
G 6	69	17	50	6	73		3	1	4	59	5	1	65
G 7	35	7	13	10	30		2	1	3	25	2		27
G 8	48	17	22	9	48	1	2	4	7	37	4		41
G 9	39	19	19	5	43	1	1		2	30	4	1	35
G 10	53	13	25	7	45		4	1	5	34	3	2	39
G 11	67	12	24	13	49	1	3	2	6	45	2		47
G 17	70	17	24	10	51		1	2	3	46	2		48
G 20	58	12	28	5	45	1	1		2	35	4		39
G 21	23	8	15	5	28					14	3	2	19
G 22	61	7	23	8	38	2	1	1	4	33	2		35
G 24	29	4	8	2	14	2	1		3	14			14
G 33	36	6	15	5	26	2			2	21	2		23
Summe	799	206	345	127	678	15	28	18	61	543	51	8	602

Tabelle 10:
Da von den einzelnen Fällen nur ungleichviel Material zu erhalten war, wurden - zur besseren statistischen Auswertung - die Rohwerte auf eine Stichprobengröße von 50 Mitosen pro Fall umgerechnet.

Fälle	Gesamtzahl der Assoziationen					Zahl der fix. AAC	Anzahl u. Größe der Gruppen		
	DD	DG	GG	Summe	auf 100 umger.		2	3	Summe
G 1	10,5	25	15,8	51,3	102,6	7,8	42,9	2,6	45,5
G 2	16	14,5	11,3	41,9	83,8	6,4	36,8	1,6	38,4
G 3	21,2	21,2	6,7	49	98	3,8	32,6	5,8	39,4
G 4	8,1	30,2	11,6	49,9	99,8	5,8	38,3	3,5	42,9
G 5	21,3	13,8	6,4	41,5	83	1,1	29,7	6,6	36,3
G 6	12,3	36,2	4,4	52,9	105,8	2,9	42,9	3,6	46,8
G 7	10	18,6	14,3	42,9	85,8	5,2	35	2,8	37,8
G 8	17,7	22,9	9,4	50	100	7,3	38,5	4,2	42,7
G 9	24,4	24,4	6,4	55,1	110,2	2,6	39,0	5,2	45,5
G 10	12,3	23,6	6,6	42,5	95	4,5	30,6	2,7	35,1
G 11	9	17,9	9,7	36,6	73,2	4,2	31,5	1,4	32,9
G 17	12,1	17,1	7,1	36,3	72,6	2,1	32,2	1,4	33,6
G 20	10,3	24,1	4,3	38,7	77,4	1,8	31,5	3,6	35,1
G 21	17,4	32,6	10,9	60,9	121,8		30,8	6,6	41,8
G 22	5,7	18,9	6,6	31,1	62,2	3,2	26,4	1,6	28
G 24	6,9	13,8	3,5	24,1	48,2	5,1	23,8		23,8
G 33	8,3	20,8	6,9	35,1	70,2	2,8	29,4	2,8	32,2
Summe	223,5	375,8	141,9	738,8		66,6	571,9	56	637,7

HAUTKULTUREN

Es wurden 13 Fälle untersucht. Nachfolgend die im einzelnen gefundenen Assoziationshäufigkeiten.

Tabelle 11: Rohwerte

Fall	unters. Mitosen	Gesamtzahl der gefundenen AAC				Zahl der mit Brücken fix. AAC				Anzahl u. Größe der Gruppen			
		DD	DG	GG	Summe	D-D	D-G	G-G	Summe	2	3	4	Summe
F 123	54	6	12	3	21	-	1	-	1	21	-	-	21
F 125	44	2	10	5	17	-	1	1	2	17	-	-	17
F 128	43	8	5	-	13	-	-	-	-	13	-	-	13
F 132	49	4	8	5	17	-	-	-	-	13	2	-	15
F 133	46	5	14	3	22	-	-	-	-	22	-	-	22
F 134	32	4	4	5	13	-	-	-	-	13	-	-	13
F 135	47	7	8	1	16	-	-	-	-	14	1	-	15
F 138	41	4	11	5	20	-	3	2	5	20	-	-	20
F 139	47	4	18	-	22	2	1	-	3	22	-	-	22
F 141	41	4	3	3	10	-	-	-	-	10	-	-	10
F 142	50	5	7	3	15	1	-	-	1	15	-	-	15
F 146	44	7	15	2	24	-	-	-	-	19	1	1	21
F 148	48	5	8	3	16	-	-	-	-	16	-	-	16
Summe	586	65	123	38	226	3	6	3	12	215	4	1	220

HAUTKULTUREN

Tabelle 12: Die auf eine Stichprobengröße von 50 Mitosen pro Fall umgerechneten Rohwerte.

Fall	Gesamtzahl der AAC				auf 100 umger.	Anzahl u. Größe der Gruppen	
	DD	DG	GG	Summe		Paare	Gesamtz.
F 123	5,6	11,2	2,79	19,5	39	19,5	19,5
F 125	2,3	11,3	5,7	19,2	38,4	19,2	19,2
F 128	9,3	5,8	-	15,1	30,2	15,1	15,1
F 132	4,1	8,2	5,1	17,3	34,6	13,3	15,3
F 133	5,4	15,2	3,2	23,8	47,6	23,8	23,8
F 134	6,2	6,2	7,8	20,3	40,6	20,3	20,3
F 135	7,4	8,5	1,1	16,7	33,4	14,8	15,9
F 138	4,8	13,3	6	24,2	48,4	24,2	24,2
F 139	4,2	19,1	-	23,2	46,4	23,2	23,2
F 141	4,8	3,6	3,6	12,1	24,2	12,1	12,1
F 142	5	7	3	15	30	15	15
F 146	7,9	16,9	1,3	27,1	54,2	21,5	23,7
F 148	5,2	8,3	3,1	16,6	33,2	16,6	16,6
Summe	72,3	134,6	42,7	250,1		238,6	243,9

Tabelle 13: Anzahl der unabhängigen Assoziationen auf 100 Mitosen; Prozentsatz der Zellen mit Assoziationen.

Plazentapräparate			Hautkulturen		
Fälle	AAC auf 100 Mitosen	Zellen mit AAC in %	Fälle	AAC auf 100 Mitosen	Zellen mit AAC in %
G 1	91	55,3	F 123	39	33,3
G 2	76,8	67,7	F 125	38,4	36,4
G 3	78,8	57,7	F 128	30,2	27,9
G 4	85,8	67,4	F 132	30,6	26,5
G 5	72,6	53,2	F 133	47,6	41,3
G 6	93,6	68,1	F 134	40,6	34,4
G 7	75,6	60	F 135	31,8	27,6
G 8	85,4	70,8	F 138	48,4	41,5
G 9	91	69,2	F 139	46,4	40,4
G 10	70,2	62,3	F 141	24,2	24,4
G 11	65,8	56,7	F 142	30	26
G 17	67,2	52,9	F 146	47,4	45,4
G 20	70,2	62	F 148	33,2	27,1
G 21	83,6	69,6			
G 22	56	50,8			
G 24	47,6	37,9			
G 33	64,4	52,8			

Tabelle 14: Individuelle Verhältnisse in Beziehung assoziierte D- zu assoziierte G-Chromosomen bei Plazentapräparaten.

Fall	unters. Mitosen	Zellen mit AAC	assoziierte D	assoziierte G	D_{AS}/G_{AS}	χ^2	P
G 1	38	21	35	43	0,81	7,43	0,01
G 2	31	21	29	23	1,26	0,39	
G 3	52	30	66	36	1,8 0,87	0,94	
G 4	43	29	40	46	0,88	6,52	0,025
G 5	47	25	53	25	2,1	2,05	
G 6	69	48	84	62	1,4	0,37	
G 7	35	21	27	33	0,8	4,45	0,05
G 8	48	34	56	40	1,4	0,11	
G 9	39	27	57	29	1,96	1,41	
G 10	53	33	51	39	1,3	0,42	
G 11	67	38	48	50	0,96	4,96	0,05
G 17	70	37	58	44	1,3	0,42	
G 20	58	36	52	38	1,4	0,18	
G 21	23	16	31	25	1,2	0,97	
G 22	61	31	37	39	0,9	3,17	
G 24	29	11	16	12	1,3	0,1	
G 33	36	19	17	15	1,1	0,53	

Tabelle 15: Individuelle Verhältnisse in Beziehung assoziierte D- zu assoziierte G-Chromosomen bei Hautpräparaten.

Fall	unters. Mitosen	Zellen mit AAC	assoziierte D	assoziierte G	D_{AS}/G_{AS}	χ^2	P
F 123	54	18	24	18	1,3	0,13	
F 125	44	16	14	20	0,7	5,02	0,05
F 128	43	12	21	5	4,2	4,67	0,05
F 132	49	13	16	18	0,9	2,37	
F 133	46	19	24	20	1,2	0,54	
F 134	32	11	12	14	0,86	2,08	
F 135	47	13	22	10	2,2	1,02	
F 138	41	17	19	21	0,9	2,6	
F 139	47	19	26	18	1,44	0,01	
F 141	41	10	11	9	1,22	0,2	
F 142	50	13	17	13	1,3	0,2	
F 146	44	20	29	19	1,3	0,08	
F 148	48	13	18	14	1,28	0,18	

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABBO, S., ZELLWEGER, H. und CUANY, R.:
Satellite association in familial mosaicism.
Helv. paediat. Acta 21:293-299 (1966)

2. ARAKAKI, D.T. und SPARKES, R.S.:
Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood.
Cytogenetics 2:57-60 (1963)

3. BACK, E., ZANG, K.D.:
Untersuchung über die menschlichen Metaphasechromosomen. III. Das Assoziationsmuster akrozentrischer Chromosomen bei Müttern mongoloider Kinder und bei Vergleichspersonen.
Humangenetik 8:47-52 (1969)

4. BARTON, D.E., DAVID, F.N. und MERRINGTON, M.:
The positions of the sex chromosomes in the human cell in mitosis.
Ann. hum. Genet. 28:139-146 (1964)

5. BARTON, D.E. und DAVID, F.N.:
The analysis of chromosome patterns in the normal cell.
Ann. hum. Genet. 25:323-329 (1962)

6. BARTON, D.E., DAVID, F.N. und MERRINGTON, M.:
Numerical analysis of chromsome patterns.
Ann. hum. Genet. 26:349-353 (1963 b)

7. BARTON, D.E. und DAVID, F.N.:
The analysis of chromosome patterns in the abnormal cell.
Ann. hum. Genet. 26:349-353 (1963 a)

8. BEADLE, G.W.:
A gene for sticky chromosomes in Zea mays.
Z. indukt. Abstamm.- und Vererb.-L. 63:195 (1933)

9. BENSON, P.F.:
Protein and RNA synthesis in trisomic Down's-syndrome leukocytes.
Nature (London) 215:1290 (1967)

10. BISHUN, N.P.:
Association of human satellited chromosomes.
Experientia 22:223-225 (1966)

11. BRINK, J.M.Van, LOS, P.L. und NIENHAUS, A.J.:
Satellite associations and the identification of the Y chromosome in man.
Genetica, S'Gravenh. 33:45-51 (1962)

12. CARR, D.H.: (zit. nach Referenz 74)
Obst. and Gyn. 26,308 (1965)

13. COHEN, M.M. und SHAW, M.W.:
The association of acrocentric chromosomes 1000 normal human male metaphase cells.
Ann. hum. Genet. 31:129-139 (1967)

14. COMINGS, D.E., OKADA, T.A.:
The association of nuclear membrane fragments with metaphase and anaphase chromosomes as observed by whole mount electronmicroscopy.
Exp. Cell. Res. 63:26-68 (1970)

15. COMINGS, D.E., OKADA, T.A.:
The association of chromatin fibres with the anulae of the nuclear membrane and its bearing on chromosome structure.
Exp. Cell. Res. 62:293-303 (1970)

16. DUPRAW, E.J.:
DNA and chromosomes.
Kap. 11, S. 187-190 und Kap. 13, S. 231-233
Holt, Rinhart and Winston, Inc.
New York-Chicago-San Francisco (1970)

17. EBERLE, P.:
Die Chromosomenstruktur des Menschen in Mitosis und Meiosis.
Bd. II Fortschritte der Evolutionsforschung
Fischer Verlag Stuttgart (1966)

18. EDWARDS, I.H.:
Chromosomal association in man.
Lancet ii:317-318 (1961)

19. EVANS, H.J.:
The nucleolus, virus infection, and trisomy in man.
Nature (London) 214:361-363 (1967)

20. FERGUSON-SMITH, M., HANDMAKER, S.D.:
Observations on the satellited human chromosomes.
The Lancet 638-640 (1961 a)

21. FERGUSON-SMITH, M.A. und HANDMAKER, S.D.:
Observations on the human chromosomes.
Lancet ii:1362 (1961 b)

22. FERGUSON-SMITH, M.A. und HANDMAKER, S.D.:
The association of satellited chromosomes with specific regions in cultured human somatic cells.
Ann. hum. Genet. 27:143-156 (1963)

23. FERGUSON-SMITH, M.A.:
The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes.
Cytogenetics 3:124-134 (1964)

24. FERGUSON-SMITH, M.A.:
Chromosomal satellite association.
Lancet I:1156-1157 (1967)

25. FERGUSON-SMITH, M.A.:
Chromosomal satellite association.
Lancet i:1156 (1967)

26. FRØLAND, A. und MIKKELSEN, M.:
Studies on satellite associations in human cells.
Hereditas 52:248 (1964)

27. GALPERIN, H.:
Comparative study of the association of human acrocentric chromosomes in male and female mitoses.
Cytogenetics 7:447-454 (1968)

28. GALPERIN, H.:
Number of each type of acrocentric association and probability of its occurrence in human male and female metaphase cells.
Cytogenetics 8:439 (1969)

29. HARNDEN, D.G.:
The chromosomes, S. 19
In "Recent advances in human genetics"
hrsg. von L.S. Penrose (Little Brown, Boston 1961)

30. HANSSON, A.:
Differences in the satellite association pattern in the human population.
Hereditas 66:21-30 (1970 a)

31. HANSSON, A.:
The influence of culture method on the satellite association pattern in human lymphocytes: Macroculture versus microculture.
Hereditas 66:31-34 (1970 b)

32. HASELOFF-HOFFMANN:
Kleines Lehrbuch der Statistik.
De Gruyter-Verlag, Berlin

33. HEITZ, E.:
Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nukleolen.
Planta 12:775-844 (1931)

34. HEMEL van, J.O.:
Studies on human chromosome satellite association. Proefschrift. Ter Verkrijging van de graad van doctor in de wiskunde en natuswetenschappen aan de Rijksuniversiteit te utrecht, op gezag van de Rector Magnificus Prof. Dr. F. van der Blij volgans besluit van de genaat in het openbaar te verdedigen op maandag 17.Mei 1971
Bronder-Offset N.V., Rotterdam 1971

35. HOEHN, H., NAGEL, M., KRONE, W.:
In vitro alteration of association patterns of human acrocentric chromosomes.
Humangenetik 15:146-154 (1971)

36. HOSKINS, G.C.: (zitiert nach Referenz 16)
Nature 217:748 (XI) (1968)

37. HSU, T.C., ARRIGHI, F.E., KLEVECZ, R.R. und BRINKLEY,B.R.:
The nucleoli in mitotic divisions of mammalian cells in vitro.
J. Cell. Biol. 26:539-553 (1965)

38. HUBERMAN, J.A., ATTARDI, G.:
Studies of fractionated HeLa cell metaphase chromosomes. I. The chromosomal distribution of DNA complementary to 28 S and 18 S ribosomal RNA and to cytoplasmic messenger RNA.
J. Molec. Biol. 29:487-505 (1967)

39. HUNGERFORD, D.A.:
A study of the chromosomes in leukocytes from the peripheral blood of children with leukemia.
Thesis, Univ. of Pennsylvania (1961)

40. KHAN, M.H., MARTIN, H.:
Chromosomal satellite association.
Lancet i:1057 (1967)

41. KIKUCHI, Y., AVERY, A., SANDBERG:
Chronology and pattern of human chromosome replication. II. Autoradiographic behaviour of various Y and X chromosomes.
J. Nat. Cancer Inst. 34:795 (1965)

42. KIOSSOGLOU, K.A., ROSENBAUM, E.H., MITUS, W.J. und DAMESHEK, W.:
Multiple chromosomal aberrations in a patient with acute granulocytic Leukemia associated with Down's syndrom and twinning.
Blood 24:134-159 (1964)

43. KOWARZYK, H., STEINHAUS, H. und SZYMANIEC, S.:
Arrangement of chromosomes in human cells.
I. Associations in metaphase figures.
Bull. Acad. pol. Sci. biol. 13:321-326 (1965)

44. KOWARZYK, H., STEINHAUS, H. und SZYMANIEC, S.:
Arrangement of chromosomes in human cells.
II. Distribution in metaphase figures.
Bull. Acad. pol. Sci. biol. 14:401-404 (1966 a)

45. KOWARZYK, H., STEINHAUS, H. und SZYMANIEC, S.:
Arrangement of chromosomes in human cells.
III. Distribution of centromeres and orientation of chromosomes in the metaphase.
Bull. Acad. pol. Sci. biol. 14:541-544 (1966 b)

46. KOWARZYK, H., STEINHAUS, H. und SZYMANIEC, S.:
Arrangement of chromosomes in human cells.
IV. Distances between centromeres in the metaphase disc.
Bull. Acad. pol. Sci. biol. 15:21-25 (1967 a)

47. KOWARZYK, H., STEINHAUS, H. und SZYMANIEC, S.:
Arrangement of chromosomes in human cells.
V. Singularities of centromeres distribution.
Bull. Acad. pol. Sci. biol. 15: 137-142 (1967 b)

48. LAMPERT, F., BAHR, G.F. und DUPRAW, E.J.:
Cancer 24:367 (XI,XVIII) (1969)

49. LUCHSINGER, U., BÜHLER, E., MEHRES, K. und STALDER, G.:
Satellite-Assoziationen bei autosomalen und gonosomalen Chromosomenanomalien und bei Hypothyreosen.
Humangenetik 8:53-61 (1969)

50. LYONS, R.B., THOMPSON, H., BIGLEY, R.H.:
The "sticky chromosome" syndrome.
Proc. amer. Soc. hum. Genet. 20:25 (1965)

51. MERRINGTON, M. und PENROSE, L.:
Distances which involve satellited chromosomes in metaphase preparations.
Ann. hum. Genet. 27:257-259 (1964)

52. MERZ, T. und PREMPREE, T.:
Thyroxin, satellite association and trisomie.
Nature (London) 209:1198-1200 (1966)

53. MILLER, O.J., MUKHERJEE, B.B., BREG, W.R. und GAMBLE, A. van N.:
Non-random distribution of chromosomes in metaphase figures from cultured human leukocytes.
I. The peripheral location of the Y chromosomes.
Cytogenetics 2:1-14 (1963)

54. MILLER, O.J., MUKHERJEE, B.B., BREG, W.R. und GAMBLE, A. van N.:
Non-random distribution of chromosomes in metaphase figures from cultured human leukocytes.
II. The peripheral location of chromosomes 13, 17-18 and 21.
Cytogenetics 2:152-168 (1963)

55. MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., and HUNGERFORD, D.A.:
Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.
Exp. Cell. Res. 20:613-616 (1960)

56. MÜLLER, H.J.:
Variations inkaryotypes of normal premature babies, newborn babies and infants.
Humangenetik 14:33-43 (1971)

57. NANKIN, H.R., SODE, J. und BALL, M.F.:
Satellite association and Trisomy in Thyreotoxicosis.
Journal of Med. Gen. Vol. 5, No. 1, S. 45-47 (1968)

58. NAUJOKS, H., MILLER, O.J., MUKHERJEE, B.B.:
Chromosomenaberrationen bei einem Turner-Fall.
Arch. Gynäk. 198:398 (1962)

59. OHNO, S., TRUJILLO, I.M., KAPLAN, W.D., KINOSITA, R.:
Nucleolusorganisers in the cause of chromosomal anomalies in man.
Lancet ii:123-126 (1961)

60. PETERSEN, G.B., THERKELSEN, A.J.:
Observations on satellited human chromosomes.
Lancet i:1229 (1961)

61. POLANI, P.E., BRIGGS, J.H., FORD, C.E., CLARKE, C.M., BERG, J.M.:
A mongol girl with 46 chromosomes.
Lancet i:721-724 (1960)

62. PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA, A.A., GINDILIS, V.M., GRINBERG, K.N., BOGOMASOV, E.A., PODUGOLNIKOVA, O.A., ISAEVA, J.I., RADJABLI, S.I., CELLARIUS, S.P., VESHNEVA, I.V.:
Association of human acrocentric chromosomes in relation to the type of cell and age of individuals.
Cytologia, Moskau/Leningrad 8:158-159 (1966)

63. RAICU, P., VLADESCU, B., KIRILOVA, M.:
Distribution of chromosomes in metaphase-plates of Mesocetricus newtoni.
Genet. Res. Camb. 15:1-6 (1970)

64. REITALU, J.:
Some observations on the association of satellite chromosomes.
Hereditas 52:248 (1964)

65. ROSENKRANZ, W., FLECK, S.:
Die Bedeutung der Assoziation satelliten-tragender Chromosomen.
Humangenetik 7:9-21 (1969)

66. SADASIVAIAH, R.S., WATKINS, R., RAJHATHY, T.:
Somatic Association of chromosomes in diploid and hexaploid Avena.
Chromosoma 28:468-481 (1969)

67. SCHNEIDERMAN, L.J. und SMITH, C.A.B.:
Non-random distribution of certain homologous pairs of normal human chromosomes in metaphase.
Nature (London) 195:1229-1230 (1962)

68. SCHULTZ, X.J. und LAWRENCE, P.S.:
A cytological basis for a map of the nucleolar chromosome in man.
Heredity 40:31-38 (1949)

69. SHAW, M.W.:
Association of acrocentric chromosomes with the centromere region of chromosome No. 1.
Lacent i:1351-1352 (1961)

70. SIEGEL, E., TOBIAS, C.A.:
Actions of thyroid hormons on cultured human cells.
Nature (London) 212:1318-1321 (1966)

71. TIPS, R.L., SMITH, G.S., MEYER, D.L. und PERKINS, A.L.:
Familial mosaicism of a chromosome 16 abnormality associated with multiple congenital anomalies.
Amer. J. ment. Defic. 69:330-340 (1964)

72. WAGENAAR, E.B.:
End-to-end chromosomes attachments in miotic interphase and their possible significance to meiotic chromosome pairing.
Chromosoma 26:410-426 (1969)

73. WAGENAAR, E.B., SADASIVAIAH, R.S.:
End-to-end, chain-like associations of paired pachytene chromosomes of Crepis Capillaris.
Can. J. Genet. Cytol. 11:403-408 (1969)

74. WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO):
Standardisation of procedures for chromosomes studies in abortion.
Bull. Org. mond. Santé; Bull. WHO 34:765-782 (1966)

75. ZANG, K.D., BACK, E.:
Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. I. Individual features in the association pattern of the acrocentric chromosomes of normal males and females.
Cytogenetics 7:455-470 (1968)

76. ZANG, K.D., BACK, E.:
Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. II. Influence of the preparation technique on the association pattern of the acrocentric chromosomes.
Cytogenetics 8:304-314 (1969)

77. ZELLWEGER, H., ABBO, G., CUANY, R.:
Satellite association and translocation mongolism.
J. med. Genet. 3:186-189 (1966)

78. ZELLWEGER, H., ABBO, G.:
Familial mosaicism attributible to a new gene.
Lancet i:455-457 (Feb. 1965)

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. K. D. Zang für die Anregung und Unterstützung zu dieser Arbeit aussprechen.

Weiter möchte ich mich bei allen denen bedanken, die mir bei den Vorarbeiten behilflich waren.

Diese Dissertation wurde von Jan. 69 - Dez. 1970 im Rahmen der Studienbeihilfe Za 32/8 der Deutschen Forschungsgemeinschaft "Das Assoziationsmuster akrozentrischer Chromosomen als mögliche Ursache numerischer Chromosomenaberrationen" durchgeführt.

LEBENSLAUF

Am 1. Oktober 1945 wurde ich in München geboren. Meine Eltern heißen Otto und Gertrud Bierner. Ich wuchs in Wolfratshausen vor München auf und besuchte das Realgymnasium Icking, in dem ich im Jahre 1965 die Reifeprüfung ablegte. Im Herbst 1965 begann ich an der Universität München Medizin zu studieren. Im Juni 1971 bestand ich dort mein Staatsexamen. Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich im Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck, im Krankenhaus München-Schwabing und im Krankenhaus Bad Reichenhall. Im Januar 1973 erhielt ich meine Approbation zum Arzt.